Aus der Medizinischen Klinik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. G. A. Martini

- Methode zur Herstellung unentkalkter Knochenschliffe - Einfluß der Calcium- und Östrogen-Therapie auf eine Cortison-Osteoporose bei Ratten, geprüft durch morphometrische Bestimmung der Knochendichte und der nach Tetracyclin-Gabe fluoreszierenden Areale

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Raimund Teigeler

aus Delbrück

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Klinik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. G. A. Martini

- Methode zur Herstellung unentkalkter Knochenschliffe - Einfluß der Calcium- und Östrogen-Therapie auf eine Cortison-Osteoporose bei Ratten, geprüft durch morphometrische Bestimmung der Knochendichte und der nach Tetracyclin-Gabe fluoreszierenden Areale

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Raimund Teigeler

aus Delbrück

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 28.5.1968
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Professor Dr.med. R.Siegert
Referent: Privatdozent Dr.G.Strohmeyer
Correferent: Professor Dr.G.-A. Martini

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

Ziel der Arbeit ..... Seite 1

Definition und Häufigkeit der Osteoporose 1

Einteilung der Osteoporose - Pathogenese der Cortison-Osteoporose 2

a) Knochenmatrix-Hypothese
Ursachen der Osteoporose nach Albright..... 2

b) Calcium-Mangel-Hypothese 3

Klassifikation der Osteoporose nach Nordin . 5

Weitere Cortisonschäden am Skelettsystem und deren mögliche Ursachen 5

1) Tierversuche 6

2) In vitro-Versuche 6

Osteoporose nach Cortison-Therapie 7

Therapie der Osteoporose 8

a) Anabole Hormone 8

1. Tierversuche 8

2. In vitro-Versuche 9

3. Therapeutische Erfahrungen mit anabolen Hormonen bei Osteoporotikern 9

b) Östrogen-Therapie 10

1. Tierversuche 10

2. In vitro-Versuche 11

3. Therapeutische Erfahrungen bei der sogenannten Postmenopause-Osteoporose 11

c) Behandlung der Osteoporose durch erhöhte Calcium-Gaben 12

1. Beobachtungen an Osteoporotikern..... 12

2. Tierversuche 13

3. Gefahren der Calcium-Therapie 14

Diagnostik bei Verdacht auf Osteoporose 15

a) Röntgendiagnostik 15

b) Calciuminfusionstest 17

c) Biopsie und Herstellung histologischer Präparate ..... Seite 17
1. Entkalkte Präparate 17
2. Unentkalkte Präparate 18
Einbettungsmittel 18
Stückfärbung 18
Tetracyclin-Fluoreszenz 19
II. TIERVERSUCHE
Material und Methode 20
Stückfärbung und Einbettung 21
Auswertung 24
III. DISKUSSION
1. Methodische Erfahrungen 28
a) Herstellung der unentkalkten, histologischen Präparate 46
b) Betrachtung der Präparate 46
2. Besprechung der Ergebnisse 47
a) Allgemeine Bemerkungen 48
b) Effekt hoher Calcium-Gaben auf die Cortison-Osteopathie 48
c) Effekt der Östrogen-Therapie auf die Cortison-Osteopathie 49
IV. ZUSAMMENFASSUNG 49
V. LITERATURVERZEICHNIS 50
52

I. EINLEITUNG

Ziel der Arbeit:

Durch die vorliegende Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie läßt sich unentkalktes Knochenmaterial am besten bearbeiten, um zu einer histologischen Beurteilung hinsichtlich Struktur und Dichte zu kommen?
2. Läßt sich mit Cortisonderivaten bei Ratten eine Osteopathie erzeugen, die mit der menschlichen Cortison-Osteoporose vergleichbar ist?
3. Läßt sich eine Cortison-Osteopathie bei den Tieren durch gleichzeitige Gabe von Calcium oder Östrogenen verhindern?

Definition und Häufigkeit der Osteoporose.

Als Osteoporose bezeichnet man eine Verminderung von Knochengewebe im Knochen als Organ (NORDIN). Im Röntgenbild ist der porotische Knochen durch eine vermehrte Strahlendurchlässigkeit ausgezeichnet. Eine vermehrte Strahlendurchlässigkeit kann aber auch durch andere metabolische Osteopathien, z.B. Osteomalacie oder primären Hyperparathyreoidismus bedingt sein. Auch ein diffuses Plasmocytom läßt sich röntgenologisch von einer Osteoporose oft nicht unterscheiden.

CALDWELL und COLLINS bestimmten 1961 das spezifische Gewicht der Lendenwirbelkörper bei 336 unausgewählten Sektionen. Sie stellten bei 8% der Männer und 18% der Frauen eine Osteoporose fest. Alle Patienten befanden sich in einem Alter von über 40 Jahren (14). BECK und NORDIN diagnostizierten 1960 durch histologische Untersuchungen bei 12% der in einem Krankenhaus verstorbenen Männer und bei 23% der im gleichen Haus verstorbenen Frauen eine Osteoporose (11). Durch Röntgenuntersuchungen fand man bei Männern im Alter von über 50 Jahren eine Osteoporosehäufigkeit von 18 bis 20%, bei Frauen im gleichen Alter von 26 bis 29% (31;92).

Einteilung der Osteoporose - Pathogenese der Cortison-Osteoporose.

CUSHING beschrieb 1932 bei sechs von acht Patienten, die an der nach ihm benannten Erkrankung litten, " soft bones" und Kompressionsfrakturen (20). WANG und ROBBINS fanden diese Erscheinungen bei 36 Cushing-Patienten (97). Im allgemeinen nimmt man an, daß etwa 75% der an Morbus Cushing erkrankten Personen an einer Osteopathie leiden (47).

a) Knochenmatrix-Hypothese.

ALBRIGHT, dessen ätiologisch ausgerichtete Klassifizierung der Osteoporose in Tabelle 1 wiedergegeben ist, führte die Knochenveränderungen auf eine Überproduktion von Nebennierenrindenhormonen zurück und beschrieb sie als Sonderform der Osteoporose (3).

Tabelle 1
Ursachen der Osteoporose (ALBRIGHT und REIFENSTEIN).

I. Osteoblastenstörung:
   A. Mangel an Spannung und Dehnung
      1. Inaktivitätsatrophie
   B. Östrogenmangel
      1. Postmenopausische Phase
      2. Ovarielle Agenesie
   C. Kongenitaler Osteoblastendefekt
      1. Osteogenesis imperfecta
II. Störungen der Matrix:
   A. Androgenmangel
      1. Eunuchoidismus
      2. Senile Osteoporose
   B. Proteinmangel
      1. "Malnutrition"
      2. Hypovitaminose C
      3. Cushing-Syndrom
      4. "Alarmreaktion"
III. Unbekannte Störungen
   A. Akromegalie
   B. Idiopathische Osteoporose

Als Ursache dieser Erkrankung betrachtete er die eiweißaufbauhemmende Wirkung der Glucocorticoide, der sogenannten "S-Hormone", denen er die "N-Hormone" mit androgenem und anabolem Effekt gegenüberstellte. "S-Hormone" sollen eine "antianabole" Wirkung haben.
Diese These begründete er mit folgenden Argumenten:

1) Bei an Morbus Cushing erkrankten Personen sei eine positive Calciumbilanz nur schwer zu erreichen.
2) Da unter proteinarmer Diät beim Cushing-Syndrom die Stickstoffausscheidung nicht hoch sei, könne ein Übergewicht eines katabolen Prinzips nicht vorliegen.
3) Die negative Stickstoffbilanz sei bei den verschiedenen Formen der Stressreaktion nicht vollständig durch erhöhte Stickstoffzufuhr zu beseitigen, so daß auch dieser Befund mehr Ausdruck einer antianabolen als einer katabolen Wirkung der "S-Hormone" sei.
4) Das Sistieren des Epiphysenwachstums beim Morbus Cushing im Wachstumsalter sei mehr ein Beweis für die antianabole als für die katabole Wirkung der "S-Hormone".
5) Experimentell sei nachgewiesen, daß das "S-Hormon", das durch Nebennierenstimulation mit ACTH produziert wurde, die anabole Wirkung des STH inhibiere und damit antianabol sei.

Auf grund dieser Überlegungen erklärten ALBRIGHT und Mitarbeiter die Rarefizierung des Knochens beim Morbus Cushing durch verminderten Knochenanbau bei normalem Knochenabbau, wobei ein genügendes Angebot an Calcium zur Verfügung steht.
Diese Erklärung entspricht ganz den Vorstellungen, die ALBRIGHT und REIFENSTEIN (3) über die Pathogenese der Osteoporose überhaupt hatten.

b) Calciummangel-Hypothese.

Zur gleichen Zeit, als man erkannte, daß die antianabole Wirkung der Steroide durch die Gabe von anabolen Hormonen nicht aufgehoben werden konnte, beobachtete man, daß Personen mit einer Steroidosteoporose eine auffallende Aufnahmebereitschaft für Calcium zeigten und, daß sie unter

erhöhter Calcium-Zufuhr über eine Besserung ihres subjektiven Befindens berichteten. Auf grund dieser Beobachtungen griff NORDIN (67), dessen Klassifizierung der Osteoporose in Tabelle 2 wiedergegeben ist, die Vorstellungen von SHERMANN und PAPPENHEIMER (82) und von GREAVES und Mitarbeitern (34), die als Ursache der Osteoporose einen Mangel an Mineralsubstanzen vor allem an Calcium angesehen hatten, wieder auf und stellte die Calciummangel-Theorie auf. Hierbei könnte ein absolut zu niedriger Calciumgehalt der Nahrung wie bei den sogenannten "Hungerosteopathien" (Pommer 1929) eine Rolle spielen, es kann sich aber auch nach NORDIN um eine mangelhafte Anpassung der intestinalen Resorptionsleistung oder der renalen Calciumausscheidung an ein nur relativ niedriges Calciumangebot handeln.
Im Tierversuch läßt sich bei Ratten durch eine calciumarme Nahrung eine negative Calciumbilanz und damit eine Osteoporose erzeugen (67). Zu diesem Ergebnis kamen auch LINQUIST und CARISSON (15). Zur Deckung der Calciumdifferenz zwischen Einnahme und Ausscheidung wird das Skelett herangezogen. Durch einen bisher nicht geklärten Mechanismus wird sogleich auch die Matrix abgebaut, so daß keine Osteomalacie sondern eine Osteoporose entsteht (68).
Bei Patienten mit klinischer Osteoporose wurde in sehr vielen Fällen eine verminderte orale Calciumzufuhr, eine intestinale Resorptionsstörung oder eine Hypercalciurie beobachtet.
Isotopenstudien mit Ca^{47} brachten widersprüchliche Ergebnisse. Einige Autoren stellten ein normales Knochenwachstum fest (34), andere eine Verzögerung der Knochenneubildung (13). Durch erhöhte Calcium-Zufuhr läßt sich allerdings bei den meisten Osteoporotikern eine positive Calciumbilanz erreichen (80;72). Die Anhänger dieser Calciummangel-Theorie sind nun der Ansicht, daß es unter dem Einfluß einer Cortisonmedikation zu einer Hemmung der intestinalen Calciumresorption und damit zu einer negativen Calciumbilanz kommt, die bei langer Dauer zu einer Osteoporose führt. Für diese Ansicht sprechen die Beobachtungen von SLATER (85) und NORDIN (65), daß unter Dexamethason-Therapie die Calciumre-

sorption gestört ist. Im Gegensatz dazu stellten CLARK und SMITH (16) bei mit Cortison behandelten Patienten eine normale Calciumresorption fest.

Tabelle 2
Klassifikation der Osteoporose nach NORDIN.

1. Generalisierte Osteoporose		
	a) Primär	
	b) Secundär	Hyperthyreoidismus
		Cushing-Syndrom und Steroidtherapie
		Akromegalie
		Steatorrhoe
		Diabetes (?)
2. Lokalisierte Osteoporose		
	a) Primär	Noch unbekannt
	b) Secundär	Dysfunktion und Immobilisierung
		Rheumatoide Arthritis
		Sudecksche Atrophie

Weitere Cortisonschäden am Skelettsystem und deren mögliche Ursachen.

UEHLINGER (90) faßt die durch Cortison am Skelett hervorgerufenen Schäden wie folgt zusammen:

1. Stammosteoporose
2. Spontanfrakturen mit hyperplastischer Kallusbildung
3. Knocheninfarkte
4. Hemmung der enteralen Calciumresorption

Hinzuzufügen wären noch aseptische Nekrosen und Chondrolysen.

Da es bei Morbus Cushing-Kranken zu Spontanfrakturen bei normalem Röntgenbefund kommen kann (17), dürfte eine Osteoporose kaum der alleinige Cortisonschaden am Skelettsystem sein. Der Serum-Calciumspiegel und die alkalische Phosphatase liegen zur Zeit der Frakturierungen im Normbereich (17). Aus diesen Beobachtungen und aus dem Auftreten von Chondrolysen und aseptischen Nekrosen zog man den Schluß, daß das zur Calcifizierung angebotene Knochengrundgewebe

schon minderer Qualität sein müsse.
Für diese Annahme sprechen die Ergebnisse folgender Versuche:

1. Tierversuche:

1958 fand KOWALEWSKI (49), daß Cortison die Mucopolysaccharidsynthese verlangsame. Junge mit Cortison behandelte Hähne bauten weniger S_4^{35} in ihr Knochensystem ein als nicht behandelte Tiere. 1957 stellten KOWALEWSKI und LYON einen hemmenden Einfluß von Cortison auf den Einbau von Sulfat in den Frakturkallus fest (50). ROOKS und DORFMANN wiesen eine Abnahme des S^{35}-Einbaues in die Knochen junger Hühner nach, die lange Zeit mit Cortison behandelt worden waren (76). RODIN und KOWALEWSKI stellten 1963 eine Verschmälerung und Unregelmäßigkeit der primären Knochentrabekel ebenso wie lokales Fehlen von Osteoblasten in Hahnenfemuren nach Cortisonbehandlung fest (75). Dieser Befund deckte sich mit einer Verminderung des Mucopolysaccharidgehaltes. Mit histochemischen Methoden beobachtete KAPLAN 1964 eine Abnahme schwefelhaltiger Mucopolysaccharide und Proteine in den Knochen von mit Cortison behandelten Rattenfoeten (45). JESSERER (42) ist der Ansicht, daß Cortison bei Ratten den physiologischen Alterungsprozeß des Bindegewebes beschleunigt. Begründet wird diese Meinung damit, daß Cortison das Verhältnis der die Mucopolysaccharide enthaltenden Interfibrillarsubstanz zu den Fibrillen verändert und damit eine Situation schafft, wie sie in älterem Bindegewebe vorliegt.

2. In vitro-Versuche:

Bei in vitro durchgeführten Stoffwechselexperimenten beobachteten VAES und NICHOLS 1962 (91) eine Einbauhemmung von markiertem Glycin in Knochenschnitten, die in ein Inkubationsmilieu eingelegt waren, das Cortison enthielt. Dieser Befund sprach eindeutig für eine Verzögerung der Kollagensynthese. Für eine Beeinflussung der Verteilung von Calcium und Phosphat zwischen Knochensubstanz und der interstitiellen Flüssigkeit durch Glucocorticoide sprachen die Untersuchungsergebnisse von SHARTUM und NICHOLS 1961 (81).

Sie legten Knochenschnitte von Mäusen, die mit Cortison behandelt worden waren und von Mäusen, denen die Nebennieren entnommen waren, in ein Inkubationsmilieu. Sie dosierten Calcium und Phosphat bis zu einem Gleichgewicht. Im Vergleich zu den normalen Kontrolltieren beobachteten sie keine signifikante Veränderung bei den Tieren, denen die Nebennieren entfernt worden waren. In dem Inkubationsmilieu, in dem die Knochen von mit Cortison behandelten Tieren lagen, nahm die Phosphatkonzentrationab. Die Calciumkonzentration blieb unverändert. Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß die Abnahme von Phosphat im Serum, die in vivo beobachtet wurde, teilweise aus einer Veränderung der Verteilung von Phosphat zwischen der Mineralsubstanz des Knochens und der interstitiellen Flüssigkeit resultiert.

Osteoporose nach Cortison-Therapie.

1952 wurde von DE MARTINI erstmals eine Osteoporose nach Cortison-Therapie beobachtet (60). 1954 berichtete CURTIS (19) über weitere Fälle.
Im allgemeinen treten frühestens nach sechsmonatiger Behandlung mit Corticoiden, sofern die tägliche Dosis 15 mg Prednison überschreitet, pathologische Erscheinungen am Skelettsystem auf. UEHLINGER (90) berichtet jedoch von einem Patienten, der schon nach dreimonatiger Behandlung mit insgesamt 3675 mg Prednison eine ausgesprochene Osteoporose und anämische Knocheninfarkte hatte. COPE ist der Ansicht, daß keine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Osteoporose und der Höhe der Steroiddosis besteht (17). STRESEMANN und KROKOWSKI (88) bestimmten den Mineralisationsgrad der Wirbelsäule von Patienten mit chronischem Bronchialasthma nach vierjähriger Corticoidbehandlung. Die Osteoporose trat nach diesem Zeitraum nicht häufiger auf als bei Patienten vor der Cortisonbehandlung. REIFENSTEIN (74) fand bei 48 steroidbehandelten Patienten mit progressiv-chronischer Polyarthritis eine ausgesprochene Osteoporose. Eine entgegengesetzte Beobachtung machte Mc CONKEY (61). Er konnte bei mit Cortison behandelten Rheumatikern keinen höheren Prozentsatz an Osteoporose feststellen als bei einer nicht be-

handelten Kontrollgruppe, die aber eine geringere Zahl an Patienten aufwies. Untersuchungen mit radioaktivem Calcium sowie mit radioaktivem und stabilisiertem Strontium ergaben eine Verminderung der Gesamtknochenmasse und eine Verkleinerung des mobilen Calcium-pools nach Cortisonbehandlung (32). Morphometrische Untersuchungen von Frost brachten das gleiche Ergebnis (48). Mit Hilfe der Mikroradiographie wies JOWSEY (44) bei Patienten, die unter einer Cortison-Therapie standen, eine verminderte Knochenneubildung bei vermehrter Knochenresorption nach. Im Gegensatz zu ALBRIGHT (3) schreibt sie also den Glucocorticoiden eine antianabole und eine katabole Wirkung zu.
Obwohl der Mechanismus, durch den die Glucocorticoide eine Osteopathie auslösen, nicht vollkommen geklärt ist, überwiegen in der Literatur die Stimmen, die dem Cortison eindeutig diese Eigenschaft zuschreiben. Zu diesem Schluß kamen auch die Teilnehmer des zweiten Symposiums über Cortisonschäden am Skelett 1965 in Badenweiler (GOSSMANN, persönliche Mitteilung).

Therapie der Osteoporose.

a) Anabole Hormone

ALBRIGHT forderte auf grund seiner Theorie über die Entstehung der Osteoporose, die antianabole Wirkung der "S-Hormone" durch die anabole Wirkung der "N-Hormone" aufzuheben (3).

1. Tierversuche

SILBERBERG beobachtete 1956, daß Testosteron in ganz geringem Maße das Knochenwachstum stimuliert und die Resorption des metaphysären Spongiosaknochens bei Ratten hemmt (84). Eine wesentlich ausgeprägtere Wirkung hatte bei diesen Versuchen die Östrogen-Verabreichung. In einem gewissen Gegensatz dazu stehen die Versuchsergebnisse von BARKER und CROSLY (8) 1962, die nämlich bei mit Östrogen vorbehandelten Mäusen nach Testosteron-Applikation eine Steigerung der Knochenresorption sahen. Unter der Wirkung von 17-Äthyl-19-Nortestosteron beobachtete KOWALEWSKI (49) 1958 einen ver-

mehrten Einbau von S_4^{35} in die Röhrenknochen junger Hähne. Ebenso wurde eine Stimulierung des Sulfat-Einbaues in den Frakturkallus beobachtet. Diesem Hormon konnte also eine anabole Wirkung auf die Synthese der schwefelhaltigen Mucopolysaccharide des Knochens zugeschrieben werden. RODIN und KOWALEWSKI (75) konnten im Tierversuch durch gleichzeitige Gabe von synthetischen anabolen Steroiden und Cortisonderivaten die negativen Auswirkungen des Cortisons auf das Skelettsystem verhindern. Im Gegensatz dazu veröffentlichten ROOKS und DORFMAN (76) 1963, daß verschiedene Testosteronderivate (17-Äthyl-19- Nortestosteron, 4-Hydroxy-17-Alphamethyltestosteron und 4-Chlorotestosteron) den Cortisoneffekt auf das Knochengewebe nicht aufheben. DE VALDERRANA (21) gab Kaninchen Cortisonacetat (15 bis 25 mg/kg) und beobachtete eine Hemmung der Osteoblastenaktivität; das Mark wurde abnorm fettig, die Knochenresorption nahm zu. Gaben sie anabole Hormone hinzu, waren diese Veränderungen wesentlich geringer.

2. In vitro-Versuche

Der Einbau von markiertem Glycin in die Knochensubstanz nahm nicht zu, wenn dem Inkubationsmilieu Testosteron zugegeben wurde (91).

3. Therapeutische Erfahrungen mit anabolen Hormonen bei Osteoporotikern.

ALBRIGHT berichtete 1948 über einen guten therapeutischen Erfolg mit Testosteron bei ausgeprägten Osteoporosen (3). Dieser Befund konnte objektiv aber nie bestätigt werden, obwohl mehrere Autoren von einer subjektiven Minderung der durch die Osteoporose hervorgerufenen Beschwerden berichteten (27;54). Gegen eine pathogenetische Bedeutung der Androgene spricht, daß bei Eunuchen keinesfalls frühzeitig eine Osteoporose auftreten muß und, daß die Ausscheidung der 17-Ketosteroide, die zum Teil Abbauprodukte der androgenen Hormone sind, bei Personen mit Osteoporose nicht geringer ist als bei normalen Vergleichspersonen (59;27). 1964 beobachtete LAFFERTY (56) unter Androgen- und Östrogen-Therapie bei

Osteoporotikern zunächst eine Abnahme der Knochenresorption, nach langer Behandlungsdauer aber wieder eine Zunahme des pathologischen Prozesses. KUHLENCORDT, WIONTZEK und BARTELHEIMER (54) stellten 1964 eine umfangreiche Untersuchung über die von 1950 bis 1962 in ihrer Klinik behandelten 178 Osteoporotiker an. 39 Patienten waren zur Zeit der Nachuntersuchung bereits verstorben. 55 Patienten antworteten auf Anfrage nicht. Von 18 Patienten, die regelmäßig mit anabolen Hormonen behandelt wurden, berichteten 14 über eine Besserung ihrer Beschwerden, bei 4 Patienten war der Zustand unverändert. Von 49 Patienten, die unregelmäßig anabole Hormone erhielten, gaben 10 eine Besserung und 20 eine Verschlechterung ihres Befindens an, während bei 19 Patienten der Zustand unbeeinflußt blieb. 17 Patienten schließlich erhielten keine Hormone; bei vier Patienten hatten die Beschwerden zugenommen, während der Zustand bei 13 Patienten unverändert war. Leider ist in der Arbeit nicht angegeben, wie sich die 94 Patienten, deren Befinden nach der Behandlung nicht überprüft werden konnte, auf die drei Gruppen verteilten; Untersuchungen, die über eine objektive Veränderung der Osteoporose Aufschluß geben könnten, wurden ebenfalls nicht durchgeführt.
Der Effekt des Testosterons und der anabolen Hormone auf den Stickstoff-Umsatz wird von vielen Forschern anerkannt, über den Einfluß dieser Hormone auf die Calcium-Bilanz gehen die Ansichten jedoch weit auseinander. BARTTER (10) berichtete 1957 über die Verbesserung der Calcium-Bilanz bei einem Osteoporotiker nach Testosteron-Therapie. Dieser Ansicht wurde aber von vielen Autoren widersprochen (25). Die Behandlung mit hohen Calcium-Gaben wird der Therapie mit anabolen Hormonen in Bezug auf die Calcium-Bilanz für überlegen gehalten (23;32).

b) Östrogen-Therapie

1. Tierversuche

GARDNER und PFEIFFER (30) untersuchten schon 1938 die Rolle Östrogens in Bezug auf den Calcium-Stoffwechsel und den Kno-

chenumsatz bei Vögeln und Mäusen. Sie stellten eine positive Wirkung auf die Calcium-Bilanz und eine Verminderung der Knochenresorption fest. Diese Ergebnisse übertrugen sie aber nicht auf die Verhältnisse beim Menschen. Nach LINDQUIST (58) hemmen Östrogene die Resorption des metaphysären Knochens bei der Ratte.

2. In vitro-Versuche

In vitro-Versuche mit Östrogenen erbringen sehr unterschiedliche Ergebnisse. VAES und NICHOLS (91) injizierten 1962 Ratten und Mäusen Östrogene, entnahmen Knochen und legten sie in ein Inkubationsmilieu, das markiertes Glycin enthielt. Bei Mäusen nahm der Einbau des markierten Glycins in die Knochensubstanz um 44% zu, während er bei Ratten um 29% abnahm. Die Wirkung auf die Bildung der kollagenen Fibrillen war also bei diesen beiden Tierarten grundverschieden. Fügten sie dem Inkubationsmilieu Östrogen zu, so kam es zu keiner merklichen Veränderung des Einbaugrades von markiertem Glycin.

3. Therapeutische Erfahrungen bei der sogenannten Postmenopause-Osteoporose.

ALBRIGHT (4) untersuchte 1941 48 Frauen, bei denen er eine Osteoporose diagnostizierte. Alle Frauen waren jünger als 60 Jahre. Da 40 Frauen schon in der Menopause waren, leitete er daraus eine causale Beziehung zwischen Osteoporose und Menopause ab. TURNER (89) hatte schon 1938 auf die Osteoporose bei der Ovarialagenesie aufmerksam gemacht. FOURMAN dagegen untersuchte eine Patientin, die die charakteristischen Anomalien des Turner-Syndroms in Bezug auf das Skelettsystem aufwies. Diese Patientin hatte aber eine normale Ovarialfunktion, so daß es fraglich ist, ob beim Turner-Syndrom die Osteoporose wirklich durch eine Ovarialagenesie ausgelöst wird (27). Ob eine frühzeitige Osteoporose auch bei Frauen nach artefizieller Menopause auftritt, wird von einigen Forschern bejaht (89), von anderen verneint (22). Eine Nachuntersuchung von 292 Frauen in der Postmenopause, die mit Östrogenpräparaten behandelt worden waren, führten WALLACH

und HENNEMANN 1959 durch (96). 119 Patienten hatten eine Osteoporose, 103 von ihnen Wirbelzusammenbrüche. Bei allen Patientinnen waren der Serum-Calcium- und der Serum-Phosphat-Spiegel normal. Völlige Schmerzfreiheit oder wenigstens eine deutliche Schmerzlinderung traten bei 94 Patientinnen unter Östrogenbehandlung auf. Zu einer weiteren Verringerung der Körpergröße kam es bei keiner Patientin. 52 Frauen erhielten zusätzlich zu dem Östrogen noch Methyltestosteron, ohne daß dadurch das therapeutische Ergebnis gebessert wurde.

Positive Wirkung des Östrogens auf die Calcium-Bilanz:
Nach SHORR (83) senkt Östradiol-Benzoat die Calciumausscheidung im Urin. HENNEMANN und WALLACH (36) berichten ebenfalls über einen positiven Effekt des Östrogens auf die Calcium-Bilanz. NORDIN berichtet, daß sich der Serum-Calciumspiegel bei Frauen in der Menopause durch Östrogen oder dessen Derivate, z.B. Äthinyl-Östradiol senken läßt (64).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der positive Effekt der androgenen und anabolen Hormone auf die Stickstoffbilanz nicht bezweifelt wird; eine Wirkung auf den Calcium-Stoffwechsel erscheint dagegen völlig ungesichert.
Östrogene haben nur eine geringere Wirkung auf den Stickstoffumsatz, sie scheinen aber die Calciumausscheidung im Urin zu senken, und so einen positiven Effekt auf die Calcium-Bilanz zu erreichen; unklar bleibt jedoch, ob er auf einer Hemmung der Knochenresorption beruht, oder, ob die Hemmung der Knochenresorption auf die positive Calcium-Bilanz zurückzuführen ist.

c) Behandlung der Osteoporose durch erhöhte Calcium-Gaben.

1. Beobachtungen an Osteoporotikern

ADAMS und Mitarbeiter bestimmten schon 1936 die Calcium-Bilanz bei Osteoporotikern und beobachteten, daß bei erhöhter Zufuhr die Calcium-Retention zunahm (2). Die gleichen Befunde wurden 1940 von OWEN und IRVING berichtet (72). Daraus schloß man, daß Osteoporotiker eine erhöhte Aufnahmebereitschaft für Calcium haben, die auf einen Mangel dieses

Minerals, der ja bei der Osteoporose gegeben ist, beruhen könnte. Beobachtungen über Erfolge mit erhöhter Calciumzufuhr bei Osteoporose widersprechen sich. KROKOWSKI (52) gab 17 Patientinnen 180 Tage lang 1,5g ionisiertes Calcium, also insgesamt 270g. Eine Recalcifizierung der porotischen Wirbelsäule konnte nach diesem Behandlungszeitraum bei keiner Frau festgestellt werden. Auch die Retention von radioaktivem Strontium blieb nach der Calcium-Therapie unverändert. 11 Patientinnen gaben aber eine rasche Besserung der Beschwerden an. Eine genaue Bilanzuntersuchung über 120 Tage führten SCHWARZ und Mitarbeiter (79) bei einem Patienten mit idiopathischer Osteoporose durch. Es wurden 96 Tage lang 5,18g/24 Stunden Calcium verabreicht. Die Gesamtretention belief sich auf 63,4g Calcium. Eine radiologisch nachweisbare Besserung der Osteoporose trat nicht ein. Auch SCHWARZ, PANARIELLO und SAELI (80) sahen bei fünf Patienten nach fünfjähriger, erhöhter Calcium-Zufuhr weder eine klinische noch eine radiologische Besserung, allerdings auch kein Fortschreiten der Osteoporose. Bei kinetischen Untersuchungen mit Ca^{47} konnten LAFFERTY und Mitarbeiter keine Veränderung der "resorption rate" und der "accretion rate" unter Calcium-Therapie messen. Über eine objektive Besserung der Osteoporose nach hohen Calcium-Gaben wurde von NORDIN (71) berichter. Er behandelte 1964 56 Patienten, die eine radiologisch nachweisbare Osteoporose hatten, mit erhöhten Calcium-Gaben. 29 Patienten gaben nach der Behandlung Schmerzfreiheit an, bei 17 Patienten blieb der Zustand unbeeinflußt, zehn Patienten gaben keine eindeutige Auskunft. Mit Hilfe der von BARNETT und NORDIN (9) beschriebenen Röntgenmethode stellte er bei 20 Patienten eine objektive Besserung der Osteoporose fest, bei 14 Patienten war der Zustand unverändert, bei 22 Patienten hatte der osteoporotische Prozeß zugenommen. Auch bei dieser Untersuchung war also der von den Patienten empfundene Erfolg eindeutiger als der objektiv meßbare.

2. Tierversuche

JOWSEY und GERSHON-COHEN (43) erzeugten bei ausgewachsenen

Katzen durch Calciumarme Diät eine Osteoporose, die histologisch durch eine erhöhte Knochenresorption ausgezeichnet war. Sie fanden bei der Sektion der Tiere eine Parathyreoideahyperplasie, ohne daß intravital eine Erhöhung des Calciumspiegels im Serum aufgetreten wäre. Nach ihrer Ansicht wird bei Tieren die Cortison-Osteoporose durch einen sekundären Hyperparathyreoidismus auf grund einer negativen Calcium-Bilanz hervorgerufen. Die negative Calcium-Bilanz resultiert aus einer vermehrten Calciumausscheidung im Stuhl und Urin, die auf

1. eine Hemmung des aktiven Calciumtransportes durch die Darmschleimhaut
2. eine Verminderung der tubulären Reabsorption von Calcium

zurückzuführen ist. Außer einer Verminderung der Calciumwurde auch eine Verminderung der tubulären Phosphat-Reabsorption unter Cortisonwirkung beobachtet. Falls die Cortisonosteoporose auf einem sekundären Hyperparathyreoidismus beruht, könnte eine erhöhte Zufuhr von Calcium die Osteoporose heilen, zumindest aber ihr Fortschreiten verhindern. ADAMS und JOWSEY (2) konnten aber bei Kaninchen mit Cortison-Osteoporose keine günstige Wirkung einer erhöhten Calcium-Zufuhr feststellen. Sie applizierten das Calcium sowohl per os als auch intraperitoneal. Den Grad der Knochendichte bestimmten sie mit der Mikroradiographie.

3. Gefahren der Calcium-Therapie.

Da bei einer beträchtlichen Calcium-Retention keine meßbare Ablagerung des Minerals im Knochengewebe bestimmt werden konnte, glaubt ISAKSSON (40), daß das Calcium vorzugsweise extraossär abgelagert wird. Nach JESSERER (41) kann man aus Röntgenbeobachtungen schließen, daß unter Cortison-Einwirkung die Weichteile eine abnorm hohe Aufnahmebereitschaft für Calcium zeigten und vor allem die Gefäße eine weit über das Normale hinausgehende Neigung zur Verkalkung aufwiesen. NORDIN (65) beobachtete allerdings bei zwei Patienten, die röntgenologisch sichtbare Kalkeinlagerungen in der Aorta hatten, nach mehrjähriger, erhöhter Calciumzufuhr keine Zunahme dieser Einlagerungen.

Die Therapie mit Anabolica hat bei der senilen und präsenilen Osteoporose immer noch ihre Anhänger (JESSERER, KRUSKEMPER, Dtsch.Ges.Inn.Med. 1965), bei der Cortison-Osteopathie hat sie allerdings enttäuscht (GOSSMANN,2.Badenweiler Symposium 1965). Die Erfahrungen mit der Calcium-Therapie sind noch zu gering. Die Östrogene, die von Albright in die Therapie vor allem der "postmenopausischen" Osteoporose eingeführt wurden, sind bei der Cortison-Osteopathie ebenfalls noch nicht genügend geprüft worden.

Diagnostik bei Verdacht auf Osteoporose.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie der Osteoporose ist eine möglichst frühzeitige Erkennung dieser Erkrankung. Man kann sich vorstellen, daß verschmälerte Knochenbälkchen durch Steigerung der Anbaurate wieder verbreitert werden, daß aber verloren gegangene Knochenbälkchen niemals ersetzt werden können. In der Praxis heißt das, daß die Tragfähigkeit eines rarefizierten Wirbelkörpers wieder gesteigert werden kann, daß aber ein Deckplatteneinbruch unwiderruflich ist.

a) Röntgendiagnostik

Mit der normalen Röntgenuntersuchung erfaßt man eine Osteoporose erst, wenn mindestens 30 bis 40% der Hartsubstanz verloren gegangen sind (95). Um geringere Verluste zu verifizieren, wurden neuere Röntgenverfahren zur Messung der Knochendichte angegeben.

1. Nach BARNETT und NORDIN (9) werden a.p.-Aufnahmen der Hände, eines Oberschenkels und eine seitliche Aufnahme der Lendenwirbelsäule mit dem Zentralstrahl auf den dritten LWK gerichtet, angefertigt. Dann werden von der breitesten Stelle des Femurschaftes und des dritten Metacarpale die Corticalisbreite und die Schaftbreite gemessen. Hieraus wird der Quotient Corticalisbreite / Schaftbreite gebildet und dieser mit 100 multipliziert. An der Wirbelsäule wird das Verhältnis der Wirbelkörperhöhe in der Mitte der Wirbelkörper und im vorderen Anteil gebildet und ebenfalls mit 100 multipliziert. Die so erhaltenen Bewertungsziffern deuten für

die Wirbelsäule bei einem Wert von 80 und darunter auf eine Osteoporose hin. Bei den peripheren Knochenabschnitten liegt der Grenzwert für die Summe der Bewertungsziffern von Hand und Femur bei der Osteoporose um 88.

2. Das Verfahren von KROKOWSKI (51;53) ist geeignet, eine Aussage über den Mineralgehalt pro ccm Knochen an jeder beliebigen Stelle des Körpers zu machen. Es werden zwei Aufnahmen - eine mit normaler Anodenspannung (65 KV), eine zweite mit der Therapieröhre (180 bis 250 KV) gemacht. Diese Aufnahmen werden hinsichtlich der Schwärzungsdifferenz zwischen durchstrahltem Knochen und Weichteilgewebe miteinander verglichen. Bei der 65 KV-Aufnahme ist die Strahlenabsorption von der Ordnungszahl, der Dicke und Dichte der durchstrahlten Körper abhängig. Bei der härteren Strahlung spielt die Ordnungszahl keine Rolle mehr. Der Quotient der Schwärzungsdifferenzen beider Aufnahmen gibt Aufschluß über den Kalksalzgehalt der Knochen.

3. Vergleichende densiometrischen Methoden wurden von NORDIN (69) und HEUCK (37) entwickelt. Nordin benutzte als Referenzsystem eine in Formalin gelagerte Wirbelsäule, während Heuck zu diesem Zwecke eine Hydroxyapatittreppe diente. Bei dieser Untersuchungsmethode sollen schon Dichteunterschiede von 5 bis 10% erfaßbar sein.

4. VIRTAMA (93) hat versucht, den Schwärzungsgrad auf dem Röntgenbild durch die chemische Analyse des Silbergehaltes in der Filmemulsion zu messen und dadurch Rückschlüsse auf die Knochendichte zu ziehen.

Wo objektiv messende Verfahren zur Bestimmung der Knochendichte nicht zur Verfügung stehen, ist besonderer Wert auf die charakteristischen Formveränderungen der Wirbel zu legen. Die Ausbildung von Fischwirbeln im Bereich der LWS ist allerdings nur zu erwarten, wenn noch elastische Bandscheiben vorhanden sind (78) und der Krankheitsprozeß schon relativ weit fortgeschritten ist.

b) Calciuminfusionstest

Die Calciumbindungsfähigkeit des Skeletts kann mit dem In-

fusionstest nach NORDIN und FRASER (70) geprüft werden. 15 mg/kg Körpergewicht Calcium werden innerhalb von vier Stunden in 500 ml physiologischer Kochsalzlösung infundiert. Der Urin der vorhergehenden Tage wird gesammelt und die tägliche Calcium-Ausscheidung festgestellt. Von Beginn der Infusion an wird der Urin in drei vierstündigen und einer zwölfstündigen Portion gesammelt. Blutproben werden vor der Infusion, bei Beendigung der Infusion und 24 Stunden nach der Infusion entnommen und der Calcium- und Phosphatspiegel im Serum bestimmt. Die Zwölfstunden-netto-Ausscheidung (Zwölfstunden-Ausscheidung minus der Hälfte der Basisausscheidung) beträgt bei gesunden Menschen 33 bis 53%. Bei der Osteomalcie ist die Ausscheidung signifikant erniedrigt, bei der Osteoporose erhöht oder normal.

c) Biopsie und Herstellung histologischer Präparate.

1. entkalkte Präparate

Wie bei den Erkrankungen anderer Gewebe und Organe, so hat man sich auch bei Allgemeinerkrankungen des Knochensystems bemüht, durch Gewinnung und anschließende histologische Untersuchung des befallenen Gewebes ein möglichst genaues Bild von der Art und dem Grad der Erkrankung zu gewinnen. Schwierigkeiten ergeben sich nicht nur bei der Biopsie, sondern noch mehr bei der Herstellung histologischer Präparate. Die Biopsie entnimmt man bei Patienten aus dem Beckenkamm, da er bei der Osteoporose fast immer befallen ist.(63) Am entkalkten Knochenschnitt kann der Befund auch in klinisch und röntgenologisch schweren Fällen von Osteoporose negativ sein (33). WAGNER (95) führt diese mangelhaften Ergebnisse der herkömmlichen Histologie darauf zurück, daß

1. das Knochengewebe durch die chemische Entkalkung nachgiebiger wird und beim Schneiden in dem weichen Einbettungsmittel beträchtliche Verformung erleidet.
2. der entkalkte Knochen bei der histologischen Präparation erheblich und dazu noch unregelmäßig schrumpft, so daß eine quantitative Messung der Knochendichte nicht möglich ist.
3. das Osteoid von der intravital mineralisierten Knochengrundsubstanz nicht mehr unterschieden werden kann.

Da diese histologische Methode aus den oben ausgeführten

Gründen erst bei einem Substanzverlust von 30 bis 60% (95) eindrucksvolle Befunde ergibt, ist sie der normalen Röntgenuntersuchung nicht vorzuziehen.

2. unentkalkte Präparate

Schon sehr früh wurde deshalb die Forderung nach Anfertigung unentkalkter, der intravitalen Struktur des Knochengewebes entsprechender, histologischer Präparate erhoben. Heute benutzen namhafte Osteologen wie Eger, Schenk, Frost, Burkhardt und andere zur Untersuchung der normalen Entwicklung des Knochens und der krankhaften Veränderungen am Skelettsystem unentkalkte, histologische Präparate. Zunächst kamen als Objekte von Natur aus genügend dünne Knochen, z.B. Embryoknochen in Frage. VONWILLER und LÖW (94) konnten zeigen, daß bei kleinen Fischen die mikroskopische Untersuchung lebender Knochen durch die durchsichtige Haut möglich ist. Einseitig angeschliffene Knochen können im auffallenden Licht mit Hilfe eines Opakilluminators untersucht werden. 1925 stellte CRETIN mit einem besonders harten Stahlmesser Schnitte unentkalkter Knochen her. Seine Methode und Ergebnisse beschrieb er in seinem Buch über Knochenbrüche (18). VONWILLER und Mitarbeiter stellten ihre unentkalkten Knochenschnitte mit dem von Löw bei der Firma Jung (Heidelberg) entwickelten Mikrotom KIII her (94). Die Präparate waren von feinsten, prallel laufenden Bruchlinien durchzogen. Der Abstand dieser Linien betrug etwa 5 my, im günstigsten Fall 100 my.

Einbettungsmittel

VONWILLER bettete die Knochen in Paraffin, Zelloidin oder gar nicht ein (94). Die Versuche mit der Zelloidineinbettung wurden 1947 von AXELROD (7) und 1954 von ARNOLD und JEE (6) weitergeführt. Der große Nachteil dieser Methode liegt in der langen Einbettungsdauer.
Die Einbettung der Knochenproben in Methacrylat wurde von SOGNNAES (86) 1947 beschrieben. Methacrylsäureester sind farblose Flüssigkeiten, die unter dem Einfluß von Katalysatoren und Wärme zu klarem, farblosem Glas polymerisieren. Sie sind aus den Grundstoffen: Acrylsäure CH_2=CH-COOH

und Methacrylsäure $CH_2=C(CH_3)-COOH$ aufgebaut. Es werden auch Mischungen von Methyl- und Buthylester verwendet, deren Polymerisate um so weicher sind, je mehr der Buthylester überwiegt. Nach HIRSCH und BOELLARD sind aber auch in reinem Buthylester eingebettete Objekte noch zu hart für das Schneiden auf einem gewöhnlichen Mikrotom. Als Ergebnisse ihrer Versuche fanden sie, daß die Mischung:

Methylmethacrylat stabil	10 ml
Benzoylperoxyd	0,2 g
Polyäthylenglycol 1500	5 g

ein klares, schneidbares Einbettungsmittel ergibt. Polyäthylenglycol dient als Weichmacher, Benzoylperoxyd als Polymerisationsbeschleuniger (39).
Die dieser Arbeit zugrunde liegenden histologischen Präparate wurden nach einer von EGER angegebenen Methode eingebettet (24).

Stückfärbung

Die Färbung von in Methylmethacrylat eingebetteten Knochenschnitten ist nur möglich, wenn man das Einbettungsmittel wieder herauslöst. Dadurch wird natürlich das intravitale Bild der Knochenstruktur leicht zerstört. Um diesen Schwierigkeiten zu entgehen, wurde von FROST (28) die zuerst 1930 von RUPPRICHT (77) in die Histologie eingeführte Stückfärbung mit basischem Fuchsin wieder aufgegriffen. Der in alkoholischer Lösung angewandte Farbstoff dringt sehr schnell durch das Kanalsystem des Knochengewebes in die Lacunen und Kanälchen des Knochens ein und färbt die Osteocyten samt ihren Ausläufern intensiv rot an. Unverkalkte Osteoidsäume nehmen sehr viel Farbstoff auf und erscheinen unter dem Mikroskop dunkelrot. Die Färbbarkeit der Matrix nimmt mit zunehmender Mineralisation ab; voll mineralisierter Knochen bleibt ungefärbt. Diese Abhängigkeit der Permeabilität der Matrix für Fuchsin von dem Mineralisationsgrad der Matrix wurde von Frost weiter untersucht. Auf grund dieser Untersuchungen nimmt FROST (29) an, daß die Fuchsinpermeabilität verschwindet, wenn die Apatiteinlagerung in die Matrix etwa 80% des vollen Mineralgehaltes erreicht hat.

Tetracyclinfluorescenz

Eine wesentliche Bereicherung der histologischen Beurteilungsmöglichkeiten brachte die Entdeckung von MILCH, RALL und TOBIE, daß sich Tetracyclin in den Neuanbauzonen des Knochens ablagert und fluorescenzmikroskopisch sichtbar ist (62). Die fluorescenzmikroskopisch sichtbare Anfärbung der Ossifikationszonen mit Alizarin ist schon seit längerer Zeit bekannt, jedoch ist dieser Stoff wegen seiner Toxizität nur sehr begrenzt anwendbar. Die Ablagerungszonen des Tetracyclins sind identisch mit denen des Alizarins und des radioaktiven Calciums (PADUA 73). BEVELANDER, NAKAHARA und ROLLE bewiesen 1959 durch ihre Versuche ebenfalls, daß das Tetracyclin nur in den Neuanbauzonen abgelagert wird (12). Über die Art der chemischen Bindung des Tetracyclins an die Knochensubstanz besteht noch keine endgültige Klarheit. GERALD, FINERMANN und MILCH wiesen in in vitro-Versuchen nach, daß Tetracyclin nur an Substanzen gebunden wird, die freie Ca^{++} enthalten. Sättigten sie in ihren Lösungen die Ca^{++} durch Äthylendiamin ab, wurde das Tetracyclin nicht gebunden (26). Fluorimetrische Beobachtungen von Tetracyclinlösungen zeigen in Anwesenheit von Ca^{++} Fluorescenz, fehlen die Calcium-Ionen, ist keine Fluorescenz sichtbar (26). Da es in vitro zu einer Chelatbildung zwischen Tetracyclin und Calcium kommt, nimmt man heute überwiegend an, daß diese chemische Bindung auch in vivo das Tetracyclin im Knochen hält. PADUA ist der Ansicht, daß die Bindung nicht an Calcium-Ionen erfolgt, sondern, daß es zu einer komplexen Reaktion zwischen dem Kern des Tetracyclins, des Calciums und der Knochenmatrix kommt (73). Sicher ist, daß die Fluorescenz auf der Ablagerung des chemisch unveränderten Tetracyclins beruht (73); die baktericide Wirkung erlischt allerdings nach 96 Stunden (ANDERSON, FERGUSON und BRANDE 5). Die Verteilung des Tetracyclins ist weitgehend unabhängig von der Applikationsart und Dosierung (62). MILCH und Mitarbeiter gaben 0,1 bis 200 mg/kg oral oder parenteral und sahen in allen Fällen die gleiche Fluorescenz (62). In den ersten 12 bis 24 Stunden nach Applikation ist eine diffuse Fluorescenz in allen Geweben nachweisbar, die aber durch die Eli-

mination des Antibioticums zurückgeht. Die Fluoreszenz in den während dieser Zeit neu angebauten Knochen bleibt Jahre lang erhalten und kann nur durch in vivo-Resorption abgebaut werden (87). Die Tetracyclinmarkierung wurde von vielen Forschern zum Studium des Knochenwachstums benutzt (FROST, HARRIS, ZACCALINI und andere). FROST konnte unter Ausnutzung der Fluoreszenz morphometrisch bestimmen, daß beim menschlichen Knochengewebe die Mineralisationsfront täglich um ein my in Richtung auf den Osteoidsaum vorrückt (63). Mit zunehmendem Alter sinkt die Appositionsgeschwindigkeit auf 0,8 bis 0,6 my täglich ab (63). Auffallend niedrige Werte wurden von FROST und Mitarbeitern bei Diabetikern festgestellt (46). VAN DER HEUL konnte durch morphometrische Studien 1964 feststellen, daß die Fluoreszenz in Knochenschliffen von Patienten mit Cortison-Osteoporose um etwa 14% geringer war als bei der normalen Kontrollgruppe (38).

II. TIERVERSUCHE

Material und Methode

Um eine für die tägliche Diagnostik brauchbare Methode zur Herstellung unentkalkter, histologischer Präparate zu prüfen und, um die Wirkung der Östrogentherapie und der Behandlung mit hohen Calcium-Gaben bei einer Cortison-induzierten Osteoporose im Tierversuch zu untersuchen, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

24 junge, weibliche Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 180 g wurden in vier Gruppen zu je sechs Tieren eingeteilt.

Die Tiere der Gruppe I dienten als Kontrolltiere.

Den Tieren der Gruppe II wurde Dexamethason und Ovocyclin (Östradioldipropionat) als Kristallsuspension intraperitoneal verabreicht.

Die Tiere der Gruppe III standen nur unter Dexamethason.

Den Tieren der Gruppe IV wurde ebenfalls Dexamethason als Kristallsuspension intraperitoneal gespritzt und ihrem Trinkwasser Calcium zugesetzt.

Am vierten und zweiten Tag vor der Tötung wurde allen Tieren Tetracyclin im Trinkwasser verabreicht.
Zunächst wurde der Versuch mit drei Tieren jeder Gruppe durchgeführt.

Versuch I

Gruppe I	Tier 1	Kontrolltiere	10.IV.180mg Tetracyclin 12.IV.180mg Tetracyclin	14.IV. Tötung
	Tier 2			
	Tier 3			
Gruppe II	Tier 4	4.III.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 12.III.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov.	10.IV.180mg Tetracyclin 12.IV.180mg Tetracyclin	14.IV. Tötung
	Tier 5	4.III.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 12.III.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kgKG Ov.		
	Tier 6	4.III.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 12.III.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov.		
Gruppe III	Tier 7	4.III.1mg/kg KG Dex. 12.III.1mg/kg KG Dex.	10.IV.180mg Tetracyclin 12.IV.180mg Tetracyclin	14.IV. Tötung
	Tier 8	4.III.1mg/kg KG Dex. 12.III.1mg/kg KG Dex.		
	Tier 9	4.III.1mg/kg KG Dex. 12.III.1mg/kg KG Dex.		
Gruppe IV	Tier 10	4.III.1mg/kg KG Dex. 12.III.1mg/kg KG Dex.	10.IV.180mg Tetracyclin 12.IV.180mg Tetracyclin 4.III.-13.IV. tägl.1 Tabl. Ca-Sandoz	14.IV. Tötung
	Tier 11	4.III.1mg/kg KG Dex. 12.III.1mg/kg KG Dex.		
	Tier 12	4.III.1mg/kg KG Dex. 12.III.1mg/kg KG Dex.		

Dieser Versuch wurde geringfügig abgewandelt, wiederholt:

Versuch II

	Tier 1		30.IX.180mg Tetracyclin 2.X.180 mg Tetracyclin	4.X. Tötung
Gruppe I	Tier 2	Kontrolltiere		
	Tier 3			
	Tier 4	18.IIX.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 27.IIX.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 3.IX. 1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 17.IX. 1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov.		
Gruppe II	Tier 5	18.IIX.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 27.IIX.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 3.IX. 1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 17.IX. 1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov.	30.IX.180mg Tetracyclin 2.X. 180 mg Tetracyclin	4.X. Tötung
	Tier 6	18.IIX.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 27.IIX.1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 3.IX. 1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov. 17.IX! 1mg/kg KG Dex. +1/2mg/kg KG Ov.		

	Tier 7	18.IIX.1mg/kg KG Dex.		
		27.IIX.1mg/kg KG Dex.		
		3.IX. 1mg/kg KG Dex.		
		17.IX. 1mg/kg KG Dex.		
Gruppe III	Tier 8	18.IIX.1mg/kg KG Dex.	30.IX.180mg	4.X.
		27.IIX.1mg/kg KG Dex.	Tetracyclin	Tötung
		3.IX. 1mg/kg KG Dex.	2.X. 180 mg	
		17.IX. 1mg/kg KG Dex.	Tetracyclin	
	Tier 9	18.IIX.1mg/kg KG Dex.		
		27.IIX.1mg/kg KG Dex.		
		3.IX. 1mg/kg KG Dex.		
		17.IX. 1mg/kg KG Dex.		
	Tier 10	18.IIX.1mg/kg KG Dex.		
		27.IIX.1mg/kg KG Dex.		
		3.IX. 1mg/kg KG Dex.		
		17.IX. 1mg/kg KG Dex.		
Gruppe IV	Tier 11	18.IIX.1mg/kg KG Dex.	30.IX.180mg	4.X.
		27.IIX.1mg/kg KG Dex.	Tetracyclin	Tötung
		3.IX. 1mg/kg KG Dex.	2.X. 180 mg	
		17.IX. 1mg/kg KG Dex.	Tetracyclin	
	Tier 12	18.IIX.1mg/kg KG Dex.	18.IIX.-3.X.	
		27.IIX.1mg/kg KG Dex.	tägl.1 Tabl.	
		3.IX. 1mg/kg KG Dex.	Ca-Sandoz	
		17.IX. 1mg/kg KG Dex.		

Dex. = Dexamethason
Ov. = Ovocyclin
1 Tablette Calcium-Sandoz enthält 500 mg ionisiertes Calcium.

Die Gewichtszunahme wies innerhalb der einzelnen Gruppen eine sehr große Schwankungsbreite auf, so daß ein Zusammenhang zwischen Gewichtszunahme und Versuchsbedingungen nicht abzuleiten war.
Von jedem Tier wurden drei Lendenwirbel und ein Röhrenknochen entnommen und in Methylmethacrylat eingebettet.

Stückfärbung und Einbettung.

Es wurde die Stückfärbung nach Frost mit der Einbettungsme-

thode nach EGER (24) kombiniert und in einigen Punkten abgewandelt. Man fertigt sich also 0,5 prozentige Lösungen von basischem Fuchsin in 40%, 70% und 96% igem Alkohol an. In jeder Alkohollösung wird das Knochenstück ohne Vorfixierung je nach Größe verschieden lange Zeit, aber mindestens zwei Tage belassen. Für kleine Rattenknochenstücke ist eine eintägige Färbung in 0,1 prozentiger Lösung ausreichend (SCHENK persönliche Mitteilung). In dieser aufsteigenden Alkoholreihe werden also die Knochenstücke gleichzeitig gefärbt und entwässert. Nach der Fuchsinfärbung wird das gefärbte Objekt in Xylol gewaschen. Das Xylol wird sooft gewechselt, bis die Lösung klar bleibt. Vor der Einbettung in Methacrylat wird das Knochenstück noch in eine Chloroformlösung gelegt. Die spezifischen Gewichte des Alkohols (0,79) und des Methacrylates (0,94) liegen so nahe zusammen, daß sich diese beiden substanzen nur sehr schwer verdrängen können; deshalb überführt man das Knochenstück nach der Färbung in der alkoholischen Lösung zunächst in eine Lösung, deren spezifisches Gewicht wesentlich höher liegt (Chloroform: 1,94). Man läßt das Knochenstück entweder zwei Stunden im Chloroform oder wartet solange, bis es im Glas auf den Boden gesunken ist. Nun folgt die Einbettung in Methylmethacrylat. Methylmethacrylat hat sich als Einbettungsmittel schon in der Elektronenmikroskopie bewährt; es erfüllt alle Forderungen, die man an ein brauchbares Einbettungsmittel stellen muß, nämlich

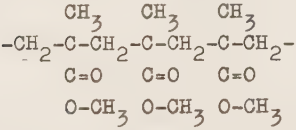
1. einfache Handhabung
2. lückenloses Eindringen in das Knochengewebe
3. hoher optischer Reinheitsgrad
4. möglichst keine Blasenbildung bei der Polymerisation
5. Eintritt der Polymerisation bei Temperaturen unter 60 Grad um Gewebsschädigungen zu vermeiden.

Das hier verwendete Methylmethacrylat ist monomer und stabilisiert, um eine vorzeitge Polymerisation zu verhindern. Drei Tage lang wird das Knochenstück in ein solches Methylmethacrylatbad, das alle 24 Stunden gewechselt wird, gelegt. Nach jedem Wechsel sollte einmal im Exsiccator evacuiert werden und zwar solange, bis keine Blasen mehr aufsteigen. Nach drei Tagen wird Plastoid E vermischt mit dem Katalysa-

tor (20g Plastoid E, 0,06g Katalysator 24) hinzugegeben. Plastoid E ist ebenfalls auf der Grundlage des Methylmethacrylates aufgebaut. In ihm sind enthalten:

1. monomeres Methylmethacrylat:

2. Polymeres Methylmethacrylat:



3. Verdünnungsmittel
4. Polymerisationsregler

Plastoid E wurde von der Firma Röhm und Haas, Darmstadt bezogen.

Man schüttet entweder das monomere Methylmethacrylat vorher ab oder, will man verhüten, daß das Knochenstück noch einmal dem Luftzutritt ausgesetzt wird, kann man das spezifisch schwerere Plastoid E über das Methylmethacrylat schütten. Das leichtere, stabilisierte Methylmethacrylat steigt dann nach oben und kann mit der Wasserstrahlpumpe abgesogen oder abgegossen werden. Nun wird im Exsiccator noch einmal evacuiert. Das Evacuieren ist zu unterbrechen, sobald Blasen aufsteigen. Das eingebettete Knochenstück wird daraufhin in einen Wärmeschrank gestellt. Um Blasenbildung durch zu schnelle Polymerisation zu vermeiden, wird die Temperatur am ersten Tag auf 37°c, am zweiten Tag auf 40°C und am dritten Tag auf 45°C eingestellt. Aber auch mit diesem Vorgehen verhindert man die Blasenbildung nicht ganz. Nach Eger soll man die Knochenstücke in ein Wärmebad stellen. Boellard beschickte das Methylmethacrylat während der Polymerisation wiederholt mit Ultraschall. Aber auch nach dieser Behandlung traten bei der Endpolymerisation häufig noch kleine Blasen auf. Bei der Fertigstellung der histologischen Präparate stören diese Blasen in den seltensten Fällen, so daß sie als Nachteil der Methode in Kauf genommen werden können.

Zu beachten ist noch, daß man die Knochenstücke einige Zentimeter hoch mit Plastoid überschichtet oder aber das Plastoid noch mit einer dünnen Glycerinschicht überdeckt, da die oberste Schicht Plastoid wegen des Luft- und Feuchtigkeitszutrittes gummiweich bleibt. Als Einbettungsgefäß verwendet man Reagenzgläser je nach Stückgröße oder Gelatinekapseln. Paraffinbeschichtete Pappebehälter wie z.B. Sputumbecher werden durch das Plastoid zersetzt und lösen sich auf. Die Glasgefäße lassen sich nach der Einbettung durch Zerschlagen leicht vom polymerisierten Methylmethacrylat lösen. Will man das Knochenstück in dem Reagenzglas in einer bestimmten Lage fixieren, um z.B. genaue Querschnitte eines Femur zu erhalten, so kann man den Boden des Reagenzglases durch Erhitzen über einem Bunsenbrenner und plötzliches Abkühlen herausprengen. Man stößt eine dünne Nadel durch einen Korken und befestigt darauf das Knochenstück in der gewünschten Lage. Als Korken benutzt man am besten echten Kork, da gummiverschlüsse vom Plastoid zersetzt werden und sich dadurch die Einbettungsflüssigkeit rötlich anfärbt. Außerdem wird durch das zersetzte Gummi die Polymerisation gestört.

Im Reagenzglas fixierter, eingebetteter Rattenfemur.

Das den Knochen enthaltende Methylmethacrylatstück wird nach Herauslösung aus dem Reagenzglas mit einem möglichst dünnen Sägeblatt in feine Scheiben zerlegt. Während des Sägevorganges kann das Sägeblatt durch einen Wassertropf oder mit Preßluft gekühlt werden. Die von WAGNER (95) entwickelte, bei der Firma Jung, Heidelberg gebaute Mikrosäge stand mir nicht zur Verfügung. Die erhaltenen Scheiben werden auf der Poliermaschine Winter PM-120 nacheinander mit Diaplast (Diamantpaste) von einer Körnung von 30 my und sieben my poliert. Mit der polierten Seite werden sie daraufhin auf einen zuvor mit Alkohol entfetteten Objektträger geklebt. Als Klebemittel wurde Eukitt verwendet. Während des Trocknens sollte man die Präparate nicht zu sehr beschweren, da wegen der Dicke der Scheiben nicht die Gefahr besteht, daß sie sich wie die mit einem Mikrotom gewonnenen Schnitte werfen. Durch zu starken Druck wird das Klebemittel zwischen Objekt und Objektträger weggedrückt. Nach 24 Stunden haften die Objekte so fest auf dem Objektträger, daß sie auf die gewünschte Dicke abgeschliffen werden können. Ich schliff die Präparate auf einer rotierenden Gußeisenplatte mit feinem Bimsteinsand bis auf eine Dicke von 50 bis 60 my. Nach dem Schleifen polierte ich die jetzt oben liegende Seite auf die gleiche Weise wie die aufgeklebte Seite. Zuvor muß aber das Schleifmittel sorgfältig abgewaschen werden. Unter einem einfachen Mikroskop kann man während des Polierens kontrollieren, ob noch vom Schleifvorgang herrührende Rillen vorhanden sind. Ist die Oberfläche vollkommen glatt, wird das Präparat eingedeckt. Als Klebemasse kann wieder Eukitt verwendet werden.

Auswertung

Der in Methylmethacrylat eingebettete, unentkalkte Knochenschliff kann als morphologisches Äquivalent des vitalen Knochens angesehen werden. Damit ist die Voraussetzung gegeben, unter dem Mikroskop quantitative Messungen der Spongiosadichte durchzuführen. Dazu benutzte ich ein Verfahren, das nach dem Prinzip der Punktzählmethode arbeitet. Hierzu

benötigt man das Integrationsokular I (Zeiss). In dem Okular befindet sich eine Glasplatte, auf der 25 Punkte assymetrisch angeordnet sind. Das Okular wird in den Mikroskoptubus eingesteckt und überdeckt mit dem Punktgitter jetzt ein Übersichtsfeld des Knochenschliffes. Jeder Punkt, der auf ein Spongiosabälkchen fällt, wird als Treffer gezählt. Über dem gleichen Übersichtsfeld wird das Okular achtmal, jeweils um 45° gedreht, so daß sich innerhalb des Zählfeldes 200 mögliche Treffer ergeben. Durch systematisches Verschieben des Knochenschliffes werden jetzt aneinander liegende Übersichtsfelder ausgezählt. Um die Knochendichte der Lendenwirbelkörper der Versuchstiere zu messen, wurden von den histologischen Präparaten eines jeden Tieres zehn Übersichtsfelder ausgezählt, d.h. es wurden bei jedem Tier 80 Zählungen mit einer möglichen Gesamttrefferzahl von 2000 durchgeführt. Da von jeder Gruppe die Präparate eines Tieres aus technischen Gründen (Verunreinigung, Ablösen des Präparates vom Objektträger beim Schleifen) nicht verwertbar waren, wurden nur die Präparate von fünf Tieren pro Gruppe ausgezählt. Der prozentuale Volumenanteil wird nun für die Spongiosa nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{tatsächliche Trefferzahl}}{\text{mögliche Trefferzahl}} = \frac{x}{100}$$

$$x = \frac{\text{tatsächliche Trefferzahl} \cdot 100}{\text{mögliche Trefferzahl}} \ \%$$

Natürlich lassen sich bei Präparaten von Rattenlendenwirbelkörpern nur jeweils zwei bis drei Übersichtsfelder auszählen, weshalb von jedem Tier vier bis fünf Präparate ausgewertet wurden. Die Punkte, die auf fluoreszierende Areale der Knochenbälkchen fielen, wurden zur morphometrischen Bestimmung der Fluoreszenz nochmals gesondert ausgewertet. Die Zählung wurde unter dem Zeiss-Mikroskop "Ortholux" bei zehnfacher Vergrößerung durchgeführt. Nach dem Nomogramm zur Fehlerbestimmung für das Integrationsokular mit Platte I der Firma Zeiss ergibt sich bei der größten gemessenen Dichte von 36,9% ein absoluter Fehler von 0,73% ; bei der geringsten Dichte von 17,6% beträgt der absolute Fehler 0,53%.

I. GRUPPE (Kontrolltiere)

A. Zahl der auf Knochenbälkchen entfallenden Punkte
B. Knochendichte in Prozent
C. Zahl der auf fluoreszierende Areale entfallenden Punkte
D. Fluoreszierende Areale in Prozent des Gesamtpräparates

1.	A.	B.	C.	D.
	78	39	19	9,5
	75	37,5	17	8,5
	71	35,5	17	8,5
	65	32,5	16	8
	80	40	18	9
	77	38,5	15	7,5
	68	34	18	9
	72	36	15	7,5
	74	37	16	8
	72	36	19	9,5
	$\bar{x}$ = 36,6 %		$\bar{x}$ = 8,5	
	s_x = 3,1		s_x = 0,8	

2.	A.	B.	C.	D.
	68	34	18	9
	51	25,5	15	7,5
	83	42,5	25	12,5
	71	35,5	27	13,5
	70	35	26	13
	80	40	24	12
	79	39,5	19	9,5
	59	29,5	20	10
	67	33,5	21	10,5
	64	32	23	11,5
	$\bar{x}$ = 34,7		$\bar{x}$ = 10,9	
	s_x = 5,09		s_x = 1,9	

$\bar{x}$ = Mittelwert der Spongiosadichte der zehn Übersichtsfelder
s_x = Standartabweichung

3.

A.	B.	C.	D.
86	43	17	8,5
72	36	15	7,5
67	33,5	20	10
62	31	14	7
70	35	18	9
73	36,5	20	10
79	39,5	20	10
68	34	18	9
82	41	20	10
80	40	16	8
$\bar{x}$=36,9 s_x=3,86		$\bar{x}$=8,9 s_x=1,94	

4.

A.	B.	C.	D.
83	42,5	17	8,5
71	35,5	15	7,5
70	35	14	7
52	26	18	8
73	36,5	21	10,5
68	34	22	11
70	35	18	9
69	34,5	19	9,5
56	28	20	10
80	40	21	10,5
$\bar{x}$=34,7 s_x=4,86		$\bar{x}$=9,25 s_x=1,31	

5.

A.	B.	C.	D.
83	41,5	15	7,5
87	43,5	18	9
54	27	21	10,5
68	34	17	8,5
61	30,5	15	7,5
70	35	22	11
62	31	14	7
80	40	16	8
83	41,5	15	7,5
60	30	13	6,5
$\bar{x}$=35,4 s_x=5,62		$\bar{x}$=8,3 s_x=1,46	

II. Gruppe (Dexamethason und Ovocyclin)

1.	A.	B.	C.	D.
	91	45,5	20	10
	61	30,5	15	7,5
	72	36	17	8,5
	80	40	19	9,5
	67	33,5	15	7,5
	75	37,5	18	9
	76	38	19	9,5
	72	36	20	10
	70	35	17	8,5
	78	39	16	8
	$\bar{x}$ =37,1	s_x=4	$\bar{x}$ = 8,8	s_x = 0,9

2.	A.	B.	C.	D.
	75	37,5	25	12,5
	61	30,5	16	10,5
	53	26,5	21	9,5
	60	30	19	10,5
	63	31,5	18	9
	60	30	21	11
	71	35,5	22	10,5
	52	26	21	9
	65	32,5	18	10,5
	62	31	21	8
	$\bar{x}$ = 31,1	s_x=3,4	$\bar{x}$ = 10,2	s_x=1,3

3.	A.	B.	C.	D.
	89	44,5	12	6
	85	42,5	8	4
	74	37	10	5
	82	41	12	6
	58	26	12	6
	82	41	17	8,5
	52	26	15	7,5
	62	31	18	9
	58	29	12	6
	60	30	16	8
	$\bar{x}$ = 35,35	s_x=2,61	$\bar{x}$ = 6,6	s_x=1,6

4.	A.	B.	C.	D.
	63	31,5	20	10
	66	33	13	6,5
	52	26	11	5,5
	49	24,5	15	7,5
	46	23	12	6
	43	21,5	11	5,5
	63	31,5	14	7
	66	33	15	7,5
	53	26,5	13	6,5
	61	30,5	12	6
	$\bar{x}$ = 28,1	s_x=4,24	$\bar{x}$ = 6,8	s_x=1,3

5.	A.	B.	C.	D.
	81	40,5	16	8
	69	34,5	15	7,5
	72	36	17	8,5
	71	35,5	26	13
	68	34	18	9
	75	37,5	20	10
	61	30,5	25	12,5
	67	33,5	17	8,5
	69	34,5	16	8
	74	37	18	9
	$\bar{x}$= 35,1	s_x=6,76	$\bar{x}$ = 9,4	s_x=1,93

III.Gruppe (Dexamethason)

	A.	B.	C.	D.
1.	34	17	7	3,5
	53	26,5	13	6,5
	43	21,5	9	4,5
	45	22,5	8	4
	40	20	6	3
	45	22,5	7	3,5
	48	24	8	4
	36	18	5	2,5
	38	19	11	5,5
	42	21	6	3
	$\bar{x}$ = 21,2	s_x=2,8	$\bar{x}$ = 4	s_x=1,5
2.	A.	B.	C.	D.
	30	15	5	2,5
	30	15	2	1
	40	20	8	4
	41	20,5	7	3,5
	35	17,5	6	3
	36	18	5	2,5
	32	16	4	2
	39	19,5	8	4
	33	16,5	7	3,5
	36	18	6	3
	$\bar{x}$ = 17,6	s_x=2	$\bar{x}$ = 2,9	s_x=0,94

3.

A.	B.	C.	D.
50	25	3	1,5
37	18,5	6	3
33	16,5	4	2
41	20,5	7	3,5
44	22	7	3,5
40	20	8	4
34	17	4	2
47	23,5	5	2,5
43	21,5	5	2,5
39	19,5	7	3,5
$\bar{x}$ = 20,4	s_x=2,7	$\bar{x}$ = 2,8	s_x=0,8

4.

A.	B.	C.	D.
40	20	7	3,5
45	22,5	13	6,5
40	20	9	4,5
41	20,5	8	4
39	19,5	7	3,5
37	18,5	6	3
30	15	7	3,5
35	17,5	4	3
32	16	7	3,5
39	19,5	6	3
$\bar{x}$ = 18,9	s_x=2,22	$\bar{x}$ = 4	s_x=0,82

5.

A.	B.	C.	D.
46	23	9	4,5
32	16	4	2
45	22,5	5	2,5
49	24,5	10	5
34	17	8	4
36	18	6	3
43	21,5	7	3,5
41	20,5	8	4
39	19,5	9	4,5
46	23	10	5
$\bar{x}$ = 20,6	s_x= 2,8	$\bar{x}$ = 3,8	s_x = 1,03

Gruppe IV (Dexamethason und Calcium)

1.	A.	B.	C.	D.
	31	15,5	7	3,5
	39	19,5	8	4
	35	17,5	4	2
	48	24	5	2,5
	41	20,5	9	4,5
	39	19,5	8	4
	44	22	7	3,5
	33	16,5	9	4,5
	40	20	9	4,5
	34	17	8	4
	$\bar{x}$ = 19,2	s_x=2,9	$\bar{x}$ = 3,7	s_x=0,83

2.	A.	B.	C.	D.
	54	27	6	3
	40	20	3	1,5
	49	24,5	7	3,5
	53	26,5	9	4,5
	39	19,5	8	4
	43	21,5	9	4,5
	40	20	10	5
	38	19	8	4
	42	21	7	3,5
	40	20	5	2,5
	$\bar{x}$ = 21,9	s_x=2,9	$\bar{x}$ = 3,6	s_x=1,03

3.

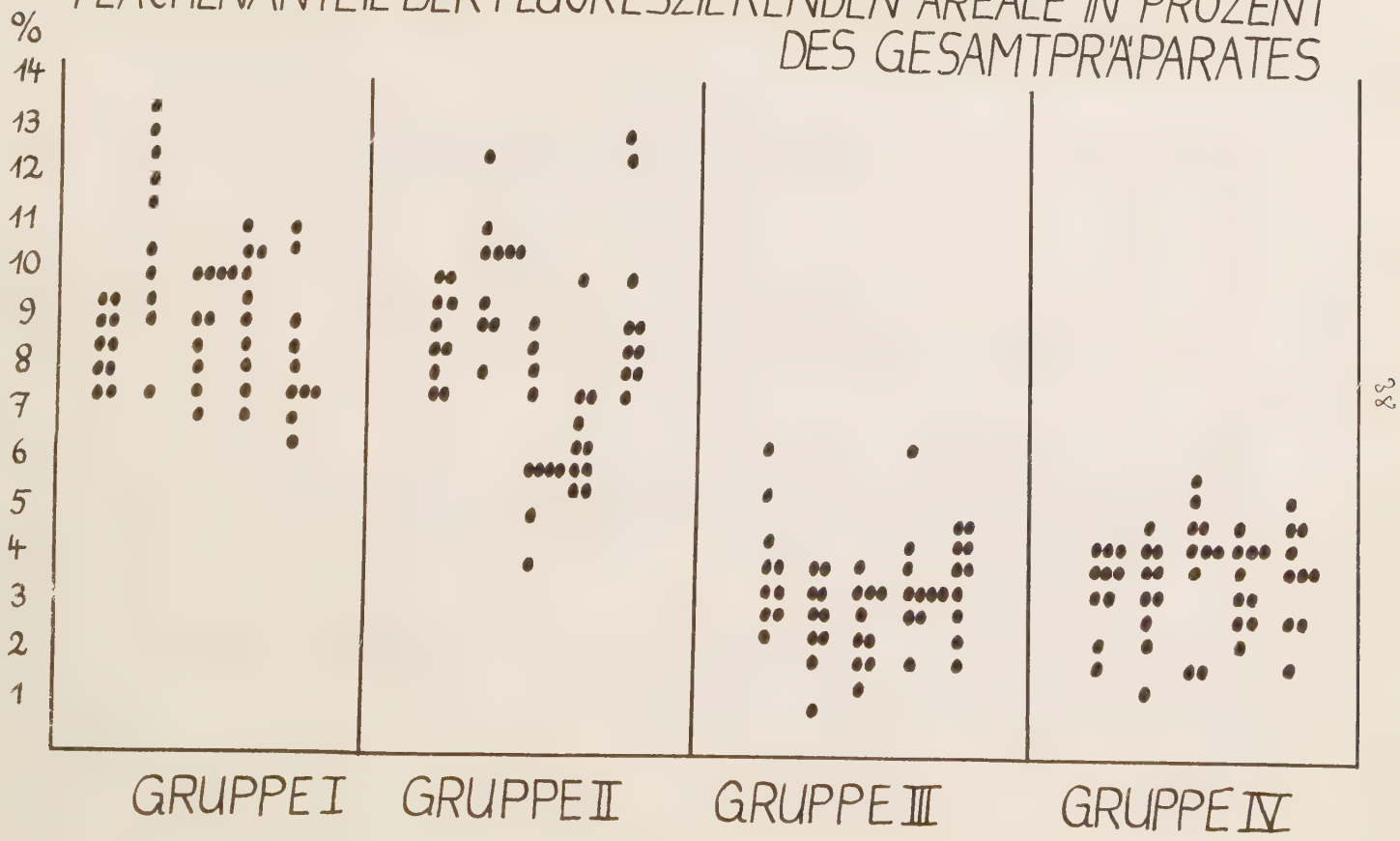
A.	B.	C.	D.
49	24,5	10	5
61	30,5	10	5
60	30	4	2
64	32	12	6
46	23	9	4,5
55	27,5	4	2
52	26	9	4,5
39	19,5	9	4,5
40	20	8	4
54	27	11	5,5
$\bar{x}$ = 26	s_x=4,3	$\bar{x}$ = 4,3	s_x=1,33

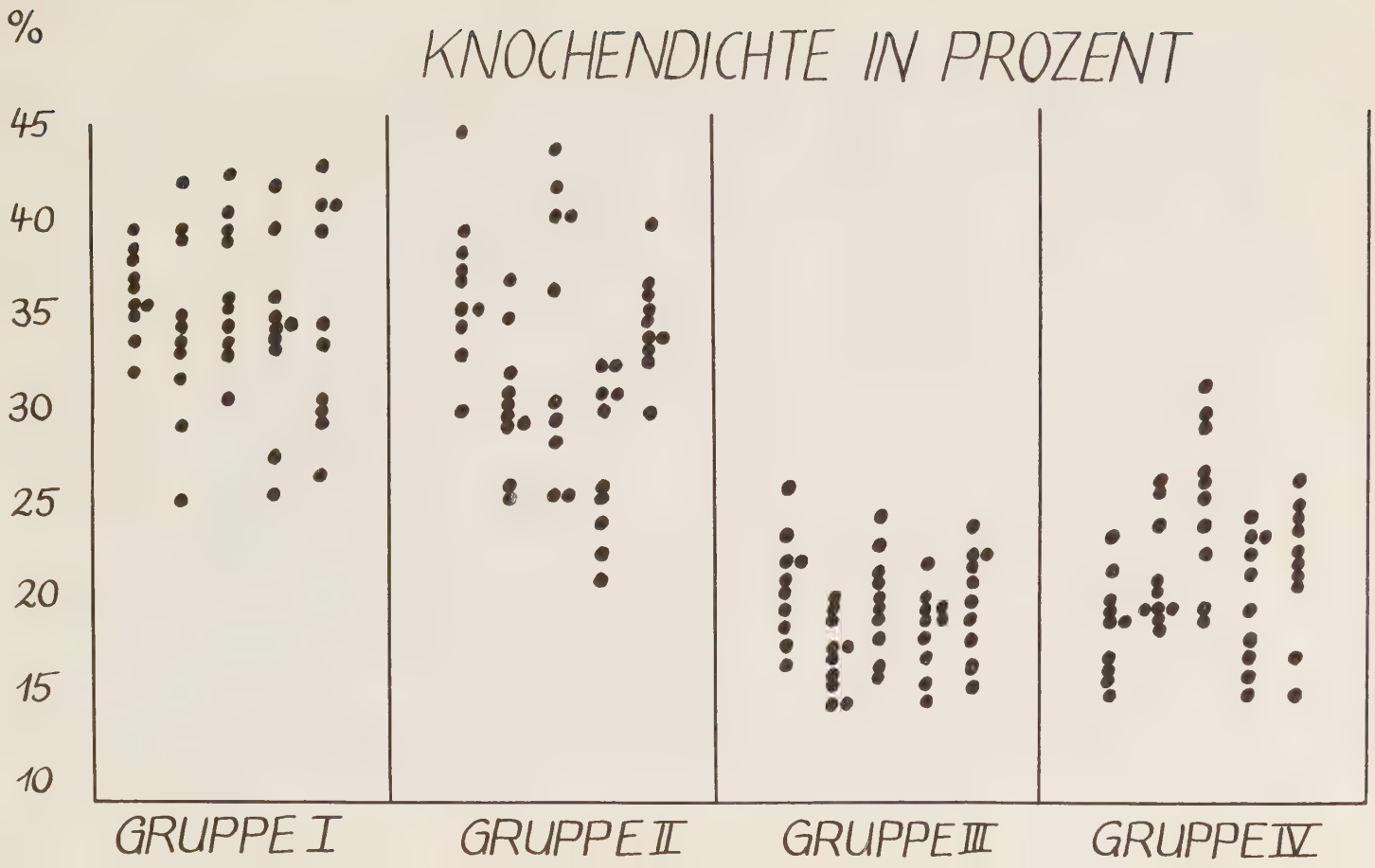
4.

A.	B.	C.	D.
35	17,5	8	4
31	15,5	9	4,5
40	20	7	3,5
37	18,5	7	3,5
50	25	6	3
44	22	9	4,5
33	16,5	10	5
48	24	5	2,5
46	23	6	3
48	24	9	4,5
$\bar{x}$ = 20,6	s_x=3,45	$\bar{x}$ = 3,8	s_x=0,82

5.

A.	B.	C.	D.
51	25,5	6	3
31	15,5	10	5
44	22	8	4
46	23	9	4,5
54	27	11	5,5
35	17,5	4	2
49	24,5	8	4
45	22,5	10	5
43	21,5	6	3
50	25	8	4
$\bar{x}$ = 22,4	s_x=3,62	$\bar{x}$ = 4	s_x=1,08


FLÄCHENANTEIL DER FLUORESZIERENDEN AREALE IN PROZENT DES GESAMTPRÄPARATES
%
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
GRUPPE I
GRUPPE II
GRUPPE III
GRUPPE IV


%
KNOCHENDICHTE IN PROZENT
45
40
35
30
25
20
15
10
GRUPPE I
GRUPPE II
GRUPPE III
GRUPPE IV

Die gefundenen Werte wurden durch einfache Varianzanalyse (Duncan-Test, Weber: Grundriß der biologischen Statistik, S.220-226) auf ihre Signifikanz überprüft. Dabei ergab sich, daß kein signifikanter Unterschied zwischen der Knochendichte der
Gruppe I und Gruppe II, ebensowenig wie zwischen der der Gruppe III und Gruppe IV bestand. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Knochendichte konnte jedoch zwischen
Gruppe I und Gruppe III, sowie zwischen
Gruppe I und Gruppe IV , ebenso zwischen
Gruppe II und Gruppe IV , schließlich zwischen
Gruppe II und Gruppe III festgestellt werden. Vergleicht man die Größe der fluoreszierenden Areale miteinander, so ergibt sich wieder ein signifikanter Unterschied zwischen
Gruppe I und Gruppe III, zwischen
Gruppe I und Gruppe IV , zwischen
Gruppe II und Gruppe III und zwischen
Gruppe II und Gruppe IV. Kein signifikanter Unterschied besteht zwischen der
Gruppe I und Gruppe II und zwischen
Gruppe III und Gruppe IV.

Um die mit der Punktzählmethode gewonnenen Ergebnisse nochmals zu prüfen, wurden von zwei Präparaten eines jeden Tieres Übersichtsaufnahmen mit einem zehnfach vergrößernden Objektiv angefertigt und im Format 15 X 10,5 abgezogen. Die auf den Papierabzügen abgebildeten Spongiosabälkchen wurden ausgeschnitten und auf einer Analysenwaage gewogen. Darauf schnitt ich von den Spongiosabälkchen die fluoreszierenden Anteile ab und wog diese nochmals gesondert. Die Knochendichte in Prozent ergab sich aus:

$$\frac{\text{Gewicht der Spongiosabälkchen}}{\text{Gewicht des Gesamtabzuges}} \cdot 100$$

Analog dazu die fluoreszierenden Anteile in Prozent:

$$\frac{\text{Gewicht der fluoreszierenden Anteile}}{\text{Gewicht des Gesamtabzuges}} \cdot 100$$

Bei dieser recht groben Meßmethode ergaben sich folgende Werte:

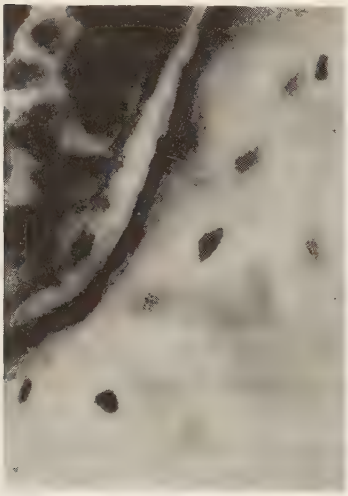
Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
1. Tier 35,2	1. Tier 35,3	1. Tier 22,9	1. Tier 20
2. Tier 32,3	2. Tier 32,8	2. Tier 20,8	2. Tier 20,9
3. Tier 37,5	3. Tier 31,5	3. Tier 18,9	3. Tier 24
4. Tier 31,6	4. Tier 30,6	4. Tier 19,5	4. Tier 21,3
5. Tier 32,2	5. Tier 34	5. Tier 22,1	5. Tier 20,4

Der Prozentanteil der fluoreszierenden Areale war bei dieser Auswertungsmethode praktisch nicht zu bestimmen, einmal, da die fluoreszierenden Anteile häufig so klein waren, daß man sie gar nicht genau ausschneiden konnte, zum anderen sind die Übergänge zwischen fluoreszierendem und nicht fluoreszierendem Anteil eines Spongiosabälkchens in vielen Fällen so fließend, daß eine Abgrenzung willkürlich ist.
Insgesamt ist diese Methode sehr ungenau, da es kaum möglich ist, mit der Schere den Verzweigungen eines Knochenbälkchens genau zu folgen und, da das verwendete Photopapier eine gleichmäßige Stärke haben müßte. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen kann man doch in den gefundenen Werten eine Bestätigung der durch die Punktzählmethode gewonnenen Werte sehen.

Eine dritte Methode zur Feststellung der Knochendichte stellt die Planimetrie dar. Um sie durchzuführen, vergrößerte ich die Negative mit dem Kopiergerät zehnfach auf ein Format von 24 X 36. Das Negativbild wurde mit dem Planimeter ausgemessen, ohne daß Abzüge angefertigt wurden. Das Planimeter wurde zu diesem Zweck nicht geeicht, da für die Bestimmung der Knochendichte ja nur das Verhältnis zwischen Gesamtfläche und Fläche der Spongiosabälkchen wichtig ist. Bei der Messung ergaben sich folgende Werte:

Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
1. Tier 34,9	1. Tier 36,3	1. Tier 20,9	1. Tier 19,8
2. Tier 31,3	2. Tier 32,4	2. Tier 19,5	2. Tier 21
3. Tier 36,7	3. Tier 35,9	3, Tier 22,3	3. Tier 23,1
4. Tier 34,1	4. Tier 30,3	4. Tier 20,1	4. Tier 18,9
5. Tier 34,3	5. Tier 31,4	5. Tier 18,7	5. Tier 21,2

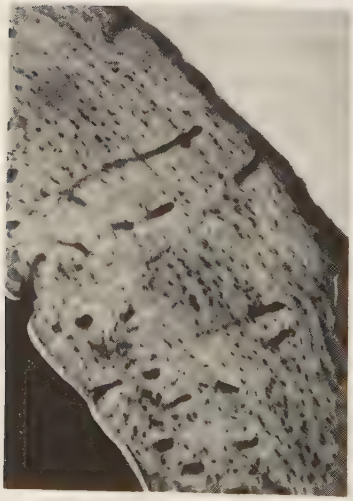
QUERSCHNITTSPRÄPARATE VON RATTENFEMURKNOCHEN

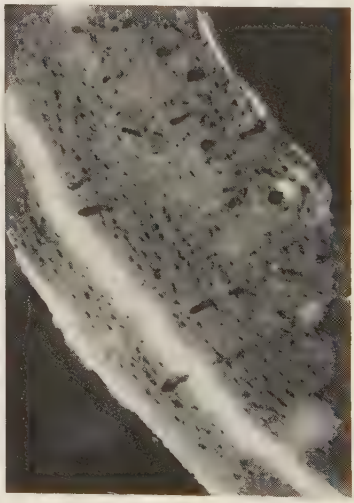


Mikroskopische Aufnahmen bei 100-facher Vergrößerung

Normallicht

UV-Licht

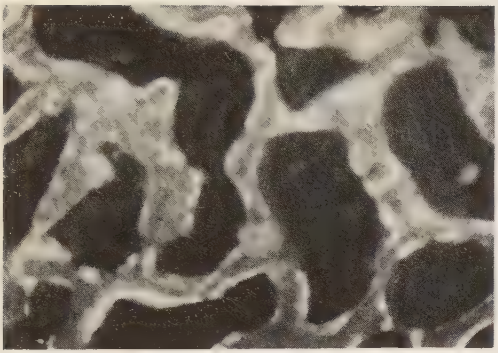




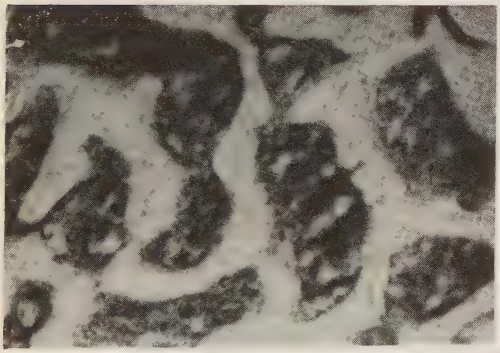
10-fache Vergrößerung

Normallicht

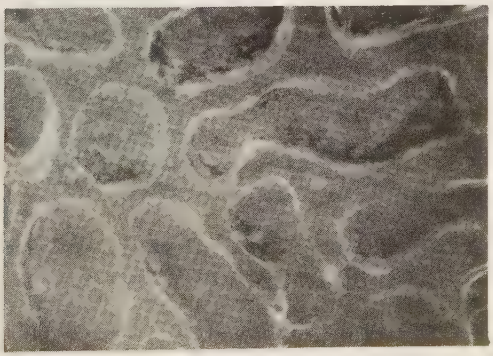
UV-Licht



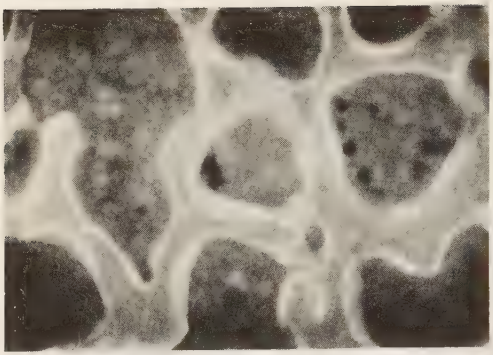
Rattenwirbel der Gruppe IV
UV-Licht



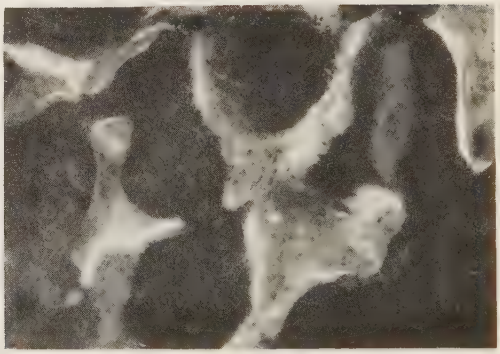
Das gleiche Präparat unter
Normallicht



Rattenwirbel der Gruppe I
UV-Licht

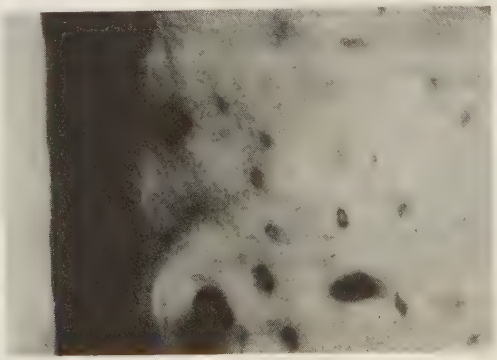


Wirbel der Gruppe II
UV-Licht



Wirbel der Gruppe III

Die Spongiosa-Aufnahmen wurden unter 10-facher Vergrößerung angefertigt.



Querschnittspräparat durch die Kompacta einer Tibia bei 100-facher Vergrößerung

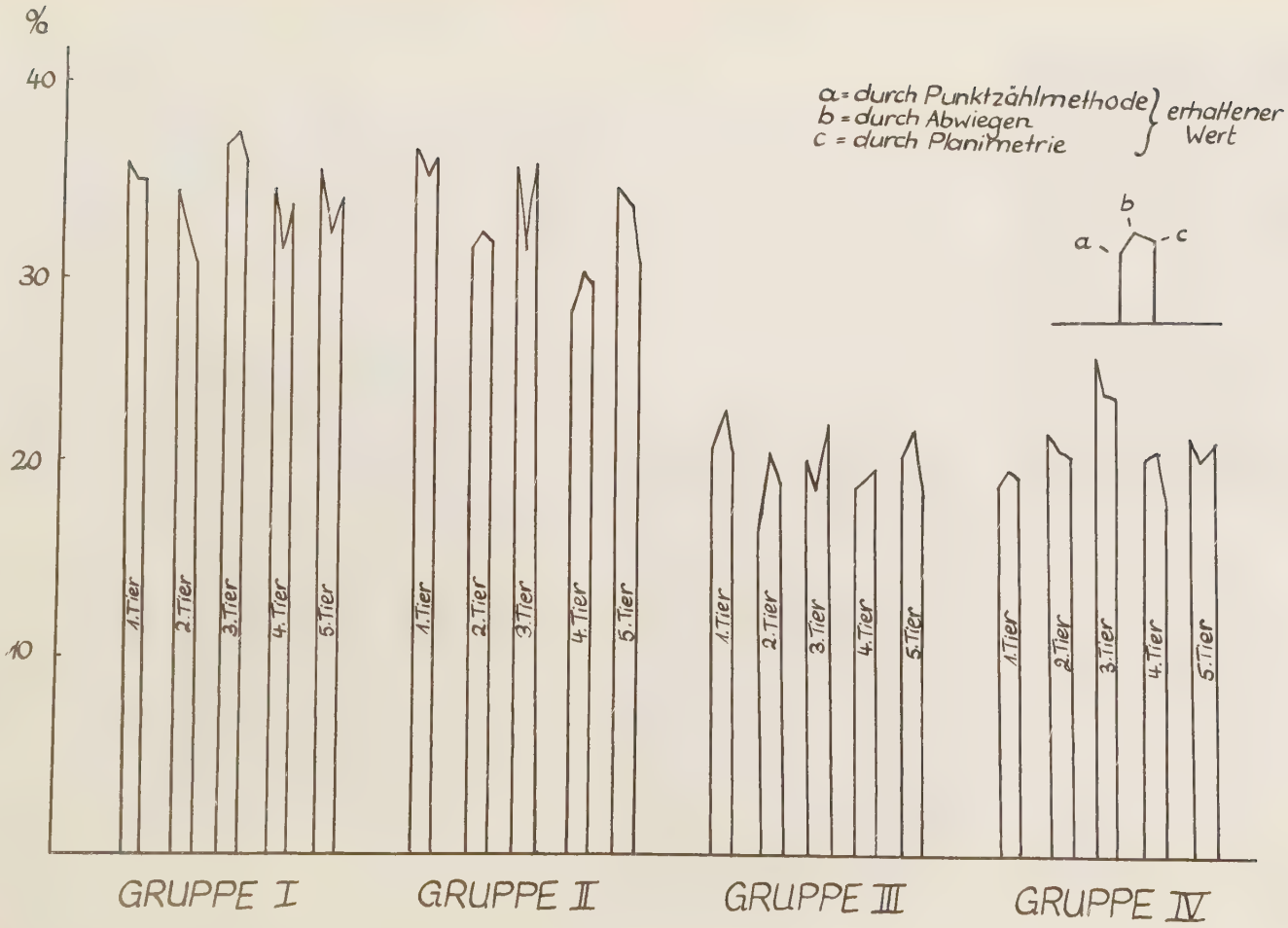
Obwohl gerade im ungewohnten Negativbild und dazu noch bei einer zehnfachen Vergrößerung die Abgrenzung der fluoreszierenden Anteile sehr schwierig ist, versuchte ich, sie auszumessen. Es ergaben sich folgende Werte:

Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
1. Tier 10 %	1. Tier 13 %	1. Tier 7 %	1. Tier 4,9%
2. Tier 8,7%	2. Tier 8,7%	2. Tier 3,5%	2. Tier 5,1%
3. Tier 10,4%	3. Tier 7,3%	3. Tier 5,1%	3, Tier 3,9%
4. Tier 7,1%	4. Tier 6,9%	4. Tier 6,4%	4. Tier 5 %
5. Tier 12,5%	5. Tier 8 %	5. Tier 4,1%	5. Tier 5,7%

Diese Werte weichen sehr von den Ergebnissen der Punktzählmethode ab, was wohl auf die oben geschilderten Schwierigkeiten zurückzuführen ist. Natürlich sind bei den kleineren Werten der fluoreszierenden Anteile die Abweichungen prozentual immer höher als bei den größeren Werten der Gesamtknochendichte. Eine vergleichende Übersicht der mit den drei verschiedenen Methoden gewonnenen Werte für die Spongiosadichte gibt die Tabelle auf Seite 45.

Kurze Bewertung der histologischen Querschnittspräparate der Rattenfemurknochen.

Da zur klinischen Diagnostik der Osteoporose stets Biopsiematerial von Spongiosa verwandt wird, wurde in diesen Versuchen auf die kompakten Knochen weniger Wert gelegt. Mit ihrer Hilfe sollte lediglich festgestellt werden, inwiefern Cortison, Ovocyclin und Calcium einen hemmenden oder fördernden Einfluß auf das Dickenwachstum der Knochen haben. Dazu ist es erforderlich, kongruente Schnitte von allen Femurknochen anzufertigen, um die Dicke der Corticalis messen und vergleichen zu können. Die von mir angefertigten Schnitte haben in dieser Hinsicht keinen Aussagewert, da sie nicht an den Knochen aller Tiere in der gleichen Höhe liegen. Im Fluoreszenzmikroskop war allerdings sichtbar, daß sich an den Knochen der mit Cortison und der mit Cortison und Ca behandelten Tiere nur periostal und endostal ein dünner Fluoreszenzsaum befand, während bei den Kontrolltieren und den mit Cortison und Ovo-


%
40
30
20
10
a = durch Punktzählmethode
b = durch Abwiegen
c = durch Planimetrie
} erhaltener Wert
a
b
c
1.Tier
2.Tier
3.Tier
4.Tier
5.Tier
GRUPPE I
GRUPPE II
GRUPPE III
GRUPPE IV

cyclin behandelten Tieren periostal zwei getrennte, von den zwei Tage auseinanderliegenden Tetracyclingaben herrührende Ringe zu sehen waren. Daraus kann man eventuell schließen, daß das Dickenwachstum bei den mit Cortison und den mit Cortison und Calcium behandelten Tieren zum Stillstang gekommen ist, während die Röhrenknochen der mit Cortison und Ovocyclin behandelten Tiere noch ein Dickenwachstum zeigen.

III. DISKUSSION

1. Methodische Erfahrungen.

a) Herstellung der unentkalkten, histologischen Präparate.

Die Fixierung und Entwässerung des Materials erfolgt kombiniert mit der ersten Färbungsstufe in 40 prozentigem Alkohol. Verzichtet man auf die Stückfärbung, werden die Knochenstücke ohne Vorfixierung in das stabilisierte Methylmethacrylat-Bad gelegt. Eine Durchtränkung des Gewebes ist schon nach drei Tagen erreicht, wenn man nach jedem Wechsel des Methymethacrylates im Exsiccator evacuiert. Die Methode nach EGER (24), die hier in einigen Punkten abgewandelt wurde, sieht ein sechstägiges Methymethacrylat-Bad vor unter einem ständigen Vacuum von 30 bis 40 Torr. Nach der Einbettung des mit Methylmethacrylat durchtränkten Knochens in Plastoid E wurde wiederum auf die Einstellung eines Vacuums von 30 bis 40 Torr verzichtet; der negative Druck wurde im einzelnen Fall solange erhöht, bis Blasen aus dem Einbettungsgemisch aufstiegen; zu diesem Zeitpunkt wurde das Evacuieren unterbrochen und, sobald die Blasen zur Oberfläche des Einbettungsmittels aufgestiegen waren, der atmosphärische Druck wiederhergestellt. Auch, wenn in den Exsiccator kein Phosphorpentoxyd zur Bindung der Feuchtigkeit (EGER 24) gegeben wurde, trat bei der Endpolymerisation des Plexiglases keine durch Luftfeuchtigkeitszutritt bedingte Trübung auf. Der Verzicht auf die Einleitung der Polymerisation im Wasserbad führte nicht zu einem häufigeren Auftreten von Luftblasen.

Stellt man nun von dem eingebetteten Knochenstück histologi-

sche Präparate mit dem Schneidemikrotom her, so hat das den Vorteil, daß auch von dem normalerweise geringen Biopsiematerial zahlreiche Serienschnitte angefertigt werden können. Dieser Vorteil wird aber durch die Tatsache aufgehoben, daß die Qualität der Präparate praktisch vom Zufall abhängt (Vonwiller, Eger). Der kompakte Knochen wird in den meisten Fällen durch die Abscherung völlig zertrümmert, aber auch das histologische Bild des Spongiosaknochens wird durch viele Risse in wechselndem Abstand beeinträchtigt.
Durch Sägen der Knochenblöcke in 1mm dicke Scheiben und anschließendes Schleifen der Scheiben lassen sich immer qualitativ gute, histologische Präparate herstellen. Der größte Nachteil der Methode liegt darin, daß durch die Dicke des Sägeblattes und durch das Schleifen der Scheiben ein großer Materialverlust eintritt, so daß sich z.B. von einem Lendenwirbel einer Ratte in der Regel nur drei Präparate herstellen lassen, sofern während der einzelnen Arbeitsvorgänge durch zu weites Abschleifen oder Zerreißen der Scheiben während des Schleifens nicht ein zusätzlicher Materialverlust eintritt. Dieser Substanzverlust wirkt sich nachteilig bei der klinischen Diagnostik aus, da bei der normalen Beckenkammbiopsie nur ein kleiner Knochenzylinder entnommen wird. Ebenfalls nachteilig wirken sich in einigen Fällen Verschmutzungen durch nicht auswaschbare Bimsteinreste aus. Auch kann bei dieser Methode die Dicke der Präparate nicht genau bestimmt werden. Alle diese Nachteile fallen weg, wenn die von Wagner bei der Firma Jung, Heidelberg, entwickelte Mikrosäge, die noch nicht im Handel ist, wie von Wagner angegeben mit einem 60 my dicken Sägeblatt Scheiben von 30 my Dikke gesägt werden können. Diese Scheiben ließen sich dann durch Polieren noch weiter verfeinern.

b) Betrachtung der unentkalkten, histologischen Schnitte.

Durch die Fixierung im Alkohol ist der Erhaltungszustand der Zellen gut. Zytologische Einzelheiten kommen allerdings nicht zur Darstellung. Durch die Stückfärbung mit basischem Fuchsin werden die osteoiden Säume und die Osteozyten mit

ihren Ausläufern sehr gut hervorgehoben.
Die Fuchsinpermeabilität (FROST) konnte nicht beurteilt werden, da die Voraussetzung, nämlich gleiche Dicke der Präparate nicht gegeben war. Da sich im histologischen Bild das Osteoid deutlich von der verkalkten Knochengrundsubstanz abhebt, ist die Osteoporose von der Osteomalacie gut abgrenzbar. Auch die Frage nach einem eventuellen Hyperparathyreoidismus kann beantwortet werden.
Die morphometrische Bestimmung der Spongiosadichte und der tetracyclin-markierten Areale mit der Punktzählmethode bereitet keine Schwierigkeiten.
Abschließend läßt sich sagen, daß mit dieser Methode die Möglichkeit besteht, zu einer ausreichenden, histologischen Beurteilung hinsichtlich Struktur und Dichte eines Knochens zu kommen. Wandelt man die Methode von Eger in der beschriebenen Weise ab, liegt zwischen Biopsie und Vorliegen eines unentkalkten Präparates ein Zeitraum von 10 bis 11 Tagen; verzichtet man auf die Färbung, dauert es nur 5 bis 6 Tage. Auch ist die Methode durch die Variation einfacher geworden, ohne daß die Qualität der Präparate dadurch gelitten hätte.

2. Besprechung der Ergebnisse.

a) Allgemeine Bemerkungen

Bei der morphometrischen Bestimmung der Knochendichte zeigte sich, daß man mit der Punktzählmethode, der Abwägung und der Planimetrie zu annähernd gleichen Ergebnissen kommt. Die Punktzählmethode ist in der Anwendung sehr einfach und ohne großen Materialaufwand durchzuführen. Will man durch Abwägung oder Planimetrie zu genauen Ergebnissen kommen, muß man Photoabzüge in einer Größe von mindestens 24 X 36 cm machen.

Da bei den Cortison-behandelten Tieren eine signifikant geringere Knochendichte gefunden wurde als bei den Kontrolltieren, kann als sicher gelten, daß bei den Ratten durch das Cortison eine Osteopathie erzeugt wurde. Zu diesem Ergebnis kamen auch DE VALDERRANA (21) und JESSERER (42). Auffällig war, daß die Tiere des zweiten Versuches, denen eine erhöhte Cortisondosis verabreicht worden war, keine schwerere Osteopa-

thie aufwiesen als die Tiere des ersten Versuches. Qualitative Unterschiede ließen sich zwischen den Präparaten der mit Cortison behandelten Tiere und der Kontrolltiere nicht feststellen, so daß man die Osteopathie als Osteoporose im Sinne von REIFENSTEIN bezeichnen kann. Die Tetracyclin-markierten Anbauzonen nahmen analog der Gesamtknochendichte ab. Daraus folgt, daß die Tetracyclin-Markierung zur Erkennung der Osteoporose nicht beiträgt. Sie verdeutlicht aber, daß eine Verminderung der Neuanbaurate als eine der Ursachen der Osteoporose angesehen werden kann. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen, zu denen JOWSEY und FROST bei ihren Untersuchungen über die menschliche Osteoporose gekommen waren.

b) Effekt hoher Calcium-Gaben auf die Cortison-Osteopathie.

Ein therapeutischer Effekt erhöhter Calcium-Zufuhr konnte morphometrisch nicht festgestellt werden. Die Knochendichte lag bei den mit Calcium behandelten Tieren nicht signifikant höher als bei den Ratten, deren Cortison-Osteopathie nicht behandelt wurde. Zu diesen Ergebnissen kamen auch ADAMS und JOWSEY (2), die die Knochendichte mikroradiographisch bestimmten.
Diese Ergebnisse sprechen eindeutig gegen einen Calciummangel als alleinige Ursache der Cortison-Osteoporose, falls man voraussetzen darf, daß das Calcium, das hier per os gegeben wurde, resorbiert worden ist.

c) Effekt der Östrogen-Therapie auf die Cortison-Osteoporose.

Da kein signifikanter Unterschied zwischen der Knochendichte der Kontrolltiere und der Knochendichte der mit Ovocyclin behandelten Cortison-Tiere bestand, darf man annehmen, daß durch die gleichzeitige Verabreichung von Östrogenen der Cortisoneffekt auf das Skelettsystem coupiert worden ist. Vergleiche mit der Östrogen-Therapie der Postmenopause-Osteoporose können nicht gezogen werden, da in den hier durchgeführten Versuchen die Cortison-Osteoporose bei jungen, wachsenden Tieren durch gleichzeitige Gabe von Östrogenen verhindert werden konnte, während bei der Postmenopause-Osteo-

porose eine schon bestehende Osteopathie, die in einem noch fraglichen Zusammenhang mit dem Erlöschen der Ovarialfunktion steht, durch Substitution der Ovarialhormone behandelt wird.

IV. ZUSAMMENFASSUNG.

Um eine für die klinische Diagnostik brauchbare und einfache Herstellungsmethode unentkalkter, histologischer Knochenpräparate zu erarbeiten und den Effekt hoher Calciumgaben und der Östrogen-Therapie bei Cortison-induzierter Osteoporose im Tierversuch zu prüfen, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

24 junge, weibliche Ratten wurden in vier Gruppen eingeteilt.

Gruppe I diente als Kontrollgruppe

Gruppe II erhielt zweimal 1mg/kg KG Dexamethason und zweimal 1/2mg/kg KG Ovocyclin

Gruppe III erhielt zweimal 1mg/kg KG Dexamethason

Gruppe IV erhielt zweimal 1mg/kg KG Dexamethason und täglich 500mg Calcium im Trinkwasser.

Allen Tieren wurde am vierten und zweiten Tag vor der Tötung 180mg Tetracyclin per os gegeben. Von jedem Tier wurden drei Lendenwirbel in Methylmethacrylat eingebettet und daraus unentkalkte, histologische Präparate hergestellt. Die dafür von Eger angegebene Methode wurde in einigen Punkten abgewandelt, was zu einer kürzeren Verarbeitungszeit bei gleichbleibender Qualität der Präparate führte. Die Knochendichte wurde mit Hilfe des Integrationsokulars von Zeiss nach der Punktzählmethode bestimmt.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse ergab, daß die Knochendichte bei den mit Dexamethason und den mit Dexamethason und Calcium behandelten Tieren signifikant niedriger lag als die Knochendichte bei den Kontrolltieren und den Tieren, die gleichzeitig mit dem Dexamethason Ovocyclin bekamen.

Daraus folgt, daß die Cortisonosteopathie durch gleichzeitige Verabreichung von Ovocyclin verhindert werden konnte, daß

aber eine erhöhte Calcium-Zufuhr keinen Effekt auf die Ausbildung der Cortison-Osteopathie hatte. Die morphometrische Bestimmung der fluoreszierenden Areale ergab, daß sie analog der Gesamtknochendichte abnahmen.

LITERATURVERZEICHNIS

1 ADAMS,M.,BOOTHBY,W.M.,SNELL,A.M.: Metabolic studies in osteoporosis.
Amer.J.Physiol.144,393

2 ADAMS,P.,JOWSEY,J.: Effect of calcium on cortison-induced osteoporosis. A preliminary communication.
Endocrinology 81,1(1967)S.152

3 ALBRIGHT,F.,REIFENSTEIN,E.: The parathyreoid glands and metabolic disease.
Baltimore, Williams & Wilkins 1948

4 ALBRIGHT,F.,SMITH,P.H.,RICHARDSON,A.M.: Postmenopausal osteoporosis.
J.Amer.med.Ass.116,2465(1941)

5 ANDERSON,R.L.,FERDUSON,A.B.,BRAUDE,A.I.: Bacteriostasis of tetracycline deposited in bone.
Surg.Gyn.Obst.108 (1959),65-67

6 ARNOLD,J.S.,JEE,W.S.S.: Embedding and sectioning undecalcified bone and its application to radioautography.
Stain Technol.29:225-239 (1954)

7 AXELROD,D.J.: An improved method for cutting undecalcified bone sections and its application to radioautography.
Anat.Rec.98:19-24 (1947)

8 BARKER,CROSLY: zitiert nach BAUD,C.A.,DUPONT,D.H.

9 BARNETT,E.,NORDIN,B.E.C.: The radiological diagnosis of osteoporosis.
Clin.Radiol.(Edinb.)11:166-174

10 BARTTNER,F.C.: Osteporosis
Amer.J.Med.22:797 (1957)

11 BAUD,C.A.,DUPONT,D.H.: Hormones et tissu osseux.
Médecine et Hygiène 23:73-76,1965

11 BECK,J.S.,NORDIN,B.E.C.: Histological assessment of osteoporosis by iliac crest biopsy.
J.Path.Bact.80:391 (1960)

12 BEVELANDER,G.,NAKAHARA,H.,ROLLE,G.K.: Inhibition of skeletal formation in the chick embryo following administration of tetracycline.
Nature 184:728-729 (1959)

13 BLUHM,M.,McGREGOR,J.,NORDIN,B.E.C.: In vitro and in vivo studies with bone seeking isotopes.
Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung
Band 4S.29 Urban & Schwarzenberg, Berlin (1960)

14 CALDWELL,P.,COLLINS,D.H.: Assessment of vertebral osteoporosis by radiographic and chemical methods of post mortem.
J.Bone Jt.Surg.43B:346 (1961)

15 CARLSSON,A.,LINQUIST,B.: Comparison of intestinal and skeletal effects of vitamin D in relation to dosage.
Acta physiolog.scand.35:53-55 (1955)

16 CLARK,J.,SMITH,M.R.: Effects of parathyreoidectomy and hydrocortisone on the intestinal absorption of calcium and phosphate.
Endocrinology 74:421 (1964)

17 COPE,C.L.: Adrenal steroids and disease.
Pitman Medical Publishing Co,Ltd. (1964)

18 CRETIN,A.: Recherche sur l'ossification et sur la réparation des os fracturés.
Le Mans, Imprimerie de l'Institut Commercial 1925

19 CURTISS,P.H.,CLARK,W.S.,HERNDORN,C.H.: Vertebral fractures resulting from prolonged cortisone and corticotropin therapy.
J.Amer.med.Ass.156:476 (1954)

20 CUSHING,H.: Basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations.
Bull.J.Hopk.50:137-195 (1932)

21 DE VALDERRAMA,J.A.F.,MUNUERA,L.M.: The effect of anabolic agents on bone.
Calcified Tissues 1965, Springer-Verlag,Berlin

22 DONALDSON,I.A.,NASSIM,J.R.: The artificiel menopause with particular reference to the occurence of spinal porosis.
Brit.med.J.1:1228 (1954)

23 DYMLING,J.F.,ISAKSSON,B.,SJOGREN,B.: Anabolic steroids in the treatment of osteopenia.
Protein Metabolism, S.412, Springer-Verlag 1962

24 EGER,W.,GÖTZ,F.,KÄMMERER,H.: Herstellung von Dünnschliffen aus Knochen- und Weichgeweben nach Markierung mit Tetracyclinen.
Lang.Arch.Klin. Chir.306:205-214

25 EVERSE,J.W.R.,KEEP,van,P.A.: Symposium an anabolic steroids.
Acta endocr.39,63 (1961)

26 FINERMAN,G.A.M.,MILCH,R.A.: In vitro binding of tetracyclin to calcium.
Nature 198, May 1963, S.486

27 FOURMAN,P.: Calciumstoffwechsel und Knochenkrankheiten.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1963

28 FROST,H.M.: Preparation of thin undecalcified bone sections by rapid manual method.
Stain technol.33:273-277 (1958)

29 FROST,H.M.: A new bone affection:feathering
J.bone and Jt.Surg.42-A,3:447-456 (1960)

30 GARDNER,W.U.,PFEIFFER,C.A.: Skeletal changes in mice receiving estrogens.
Proc.Soc.exp.Biol.27:678 (1938)

31 GERSHON-COHEN: Asymptomatic fractures in osteoporotic spines of aged.
J.Amer.med.Ass.153:625 (1953)

32 GORDAN,G.S.,EISENBERG,E.: The effect of oestrogens, androgens and corticoids on skeletal kinetics inman.
Proc.roy.Soc.Med.56:1027

33 GOSSMANN,H.H.: Zur Differentialdiagnose, Ätiologie und Therapie der Osteoporose.
Dtsch.Med.Wochschr.443-447 Bd 13 (1957)

34 GREAVES und Mitarbeiter: nach FOURMAN

35 HEANEY,R.P., WHEDON,G.D.: Radiocalcium studies of bone formation rate in human metabolic bone disease.
J.clin.Endocr.18:1246 (1958)

36 HENNEMANN,P.H.,WALLACH,S.: A review of prolonged use of estrogens and androgens on postmenopausal and senile osteoporosis.
Arch.intern.Med.100:715 (1957)

37 HEUCK,F.,SCHMIDT,E.: Die praktische Anwendung einer Methode zur quantitativen Bestimmung des Kalksalzgehaltes gesunder und kranker Knochen.
Fortschr.Röntgenstr.93:761 (1960)

38 HEUL,van,R.O.: Histological aspects of osteoporosis.
L.Ostéoporos. S.25, Hioco,D.J. Paris 1964

39 HIRSCH,von,Th.,BOELLARD,J.W.: Methacrylsäureester als Einbettungsmittel in der Histologie.
Zeitschr.wiss.Mikr.64:24-29 (1958)

40 ISAKSSON,B.: A critical evaluation of the metabolic balance technique.
Fourth Europ.Symp.on cacified tissues.
Amsterdam, Excerpta Medica Foundation 1966

41 JESSERER,H.: Über die Verhütung von Cortisonschäden am Skelett.
Wiener klin.Wochschr.78,44:745-747

42 Osteoporose
Verlag Erich Blaschker, Berlin 1963

43 JOWSEY,J.,GERSHON-COHEN,J.: Clinical and experimental osteoporosis.
Bone and Tooth, H.J.J.Blackwood, London 1964

44 JOWSEY,J.: Quantitative microradiography. A new approach in the evaluation of metabolic bone disease. Amer.J.med.40:485 (1965)

45 KAPLAN,H.S.: The effect of prednisolone in the osseous development of the fetal rat. Fed.Proc.23:236 (1964)

46 KLEIN,M.,FROST,H.M.,SEDLIN,E.: Lamellar bone physiology in diabetes mellitus. Diabetes 12:362 (1963)

47 KLEIN,M.,VILLANUEVA,A.R.,FROST,H.M.: A quantitative histological study of rib from 18 patients treated with adrenal cortical steroids. Acta orthop.scand.35:171-184 (1965)

48 KNOWLTON,A.I.: Cushings syndrome. Bull.N.Y.Acad.Med.29:441-465 (1953)

49 KOWALEWSKI: zitiert nach BAUD,C.A.,DUPONT,D.H.

50 KOWALEWSKI, LYON: zitiert nach BAUD,C.A.,DUPONT,D.H.

51 KROKOWSKI,E.: Die Absorption von Röntgenstrahlen im Knochen. Fortschr.Röntgenstr.91:76 (1959)

52 KROKOWSKI,E.,SCHÄFER,P.,FALK,I.,KÖPPE,P.:Quantitative Untersuchungen zur Calciumtherapie der Osteoporose. Med.Klin.62:1394 (1967)

53 KROKOWSKI,E.,SCHLUNGBAUM,W.: Die Objektivierung der Diagnose "Osteoporose". Fortschr.Röntgenstr.91:740 (1959)

54 KUHLENCORDT,F.,WIONTZEK,H.,BARTELHEIMER,H.: Langzeitbehandlung der Osteoporose mit anabolen Hormonen. Dtsch.med.Wochenzeitschr.90:386-390 (1965)

55 LABHART,A.,COURVOISIER,B.: Osteoporose bei Eunuchismus. Helv.med.Acta 17:475-479

56 LAFFERTY,F.W.,SPENCER,G,E.,PEARSON,O.H.: Effects of andogens, oestrogens and high calcium intakes on bone formation and resorption in osteoporosis. Amer.J.Med.36:514 (1964)

57 LAFFERTY und Mitarbeiter: zitiert nach KUHLENCORDT,F.: Pathogenese und Therapie der Osteoporose. Internist 7:11, S.552-558

57 LINQUIST,B.,BUDY,A.M.,McLEAN,F.C.,HOWAERD,J.L.: Skeletal metabolism in estrogen treated rats studied by a means of Ca^{45}. Endocrinology 66,100 (1960)

59 LOZANO-TONKIN,C.: Erfahrungen mit Calcium-Stoffwechseluntersuchungen bei Osteoporosen. Verh.Dtsch,Ges.inn.Med.71.Kongr.1965

60 MARTINI,de,F.,GROKOEST,A.W.,RAGAN,C.: Pathological fractures in patients with rheumatoid arthritis treated with cortisone. J.Amer.med.Ass.149:750 (1952)

61 McCONKEY,B.,FRASER,G.M.,BEIGH,A.S.: Osteoporosis and purpura in rheumatoid disease; prevalence and relation to treatment with corticosteroids. Quart.J.Med.XXXI,419 (1962)

62 MILCH,R.A.,RALL,D.P.TOBIE,J.E.: Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. J. Bone Jt,Surg.40A:897-910 (1958)

63 MÜLLER,J.,SCHENK,R.: Knochenstruktur und Knochenumbau. Melsunger med. Mitteilungen, Band 40,Heft 107

64 NORDIN,B.E.C.: Osteoporose Melsunger med. Mitteilung. B.40,Heft 107 (1966)

65 Hormones and calcium metabolism. Calcified tissues, Springer-Verlag, Berlin (1965)

66 The pathogenesis of osteoporosis. Lancet 1:1011 (1961)

67 NORDIN,B.E.C.: Osteomalacie und Osteoporose
Documenta Geigy, Acta clinica Nr.2

68 Osteomalacie,osteoporosis and calcium defiency.
Clin. Orthop.17:235 (1960)

69 NORDIN,B.E.C.,BARNETT,E.,McGREGOR,J.: Lumbar spine densiometrie.
Brit.med.J.1:1793-1796 (1962)

70 NORDIN,B.E.C.,FRASER,R.: Calcium-infusionstest; urinary excretion, data for recognition of osteomalacia.
Lancet 1:823-826 (1956)

71 NORDIN,B.E.C.,SMITH,D.A.: Die Behandlung der Osteoporose.
Triangel 6,7 (1964)

72 OWEN,E.C.,IRVING,J.T.: The calcium requirements of older male subjects with special reference to the genesis of senile osteoporosis.
Acta med.scand.103:235-250

73 PADUA,S.: Fluorescenza dell´osso secondario a somministrazione di Tetracycline.
Archiva Putti 19:473-490 (1964)

74 REIFENSTEIN,E.C.: Control of corticoid induced protein depletion and osteoporosis by anabolic steroid therapie.
Metabolism 7:78-89 (1958)

75 RODIN,A.E.,KOWALEWSKI,K.: Histological and histochemical effects of cortisone and an anabolic androgen on long bones of young chockerels and rats.
Canad.J.Surg.6:229-236 (1963)

76 ROOKS,W.H.,DORFMAN,R.I.: The effect of various steroids on the incorporation of radiosulfur by the growing bones of chockerels.
Metabolism 12:242-245 (1963)

77 RUPPRICHT,W.: Knochenzellen und Fortsätze der Odontoblasten von Kaltblütern, an frischen Zellen durch Fuchsin-Färbung dargestellt. Anat.Anz.71:239-243 (1930/31)

78 SCHMORL.J.,JUNGHANS,H.: Die gesunde und kranke Wirbelsäule im Röntgenbild.und Klinik. Thieme-Verlag Stuttgart 1951

79 SCHWARZ,E.,CHOKAS,W.V.,PANARIELLO,V.A.: Metabolic balance studies of high calcium intake in osteoporosis. Amer.J.Med.36:233-249 (1964)

80 SCHWART,E.,VINCENT,A.,PANARIELLO,V.A.,SAELI,J.: Radioaktive calcium kinetics during high calcium intake in Osteoporosis. J.of clin.Investig.44,9 (1965)

81 SHARTUM,NICHOLS: zitiert nach BAUD,C.A.,DUPONT,D.H.

82 SHERMAN,H.C.,PAPPENHEIMER,A.M.: A dietetic production of rickets in rats and its prevention by an anorganic salt. Proc.Soc.exp.Biol.18:193-197 (1921)

83 SHORR,E.: The possible usefulness of estrogens and aluminium hydroxide gels in the management of renal stone. J.Urol.53:507 (1945)

84 SILBERBERG,M.,SILBERBERG,R.: Faulty skeletal development in "yellow mice". Anat.Rec.124:129-143 (1956)

85 SLATER,J.D.H.,HEFFRON,E.F.,VERNET,A.,NABARRO,J.D.N.: Clinical and metabolic effects of dexamethasone. Lancet 1:173 (1959)

86 SOGNAES,R.F.: Preparation of thin serisl ground sections of whole teeth and jaws, and other highly calcified and brittle structures. Anat.Rec.99:133-144 (1947)

87 STEENDIJK,R.: Studies on the mechanism of the fixation of the tetracyclines to bone.
Bone and Tooth H.J.J.Blackwood 1964

88 STRESEMANN,E.,KROKOWSKI,E.: Der Mineralisationsgrad der Wirbelsäule nach langfristiger Corticosteroid-behandlung des chronischen Bronchialsathmas.
Klin.Wochenschr.45,11:564-569 (1967)

89 TURNER,H.H.: Syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus.
Endocrinology 23:566 (1938)

90 UEHLINGER,E.: Kortikoide und Kalziumstoffwechsel.
Melsunger med. Mitteil. 40,107:197 (1966)

91 VAES,G.M.,NICHOLS,G.: Metabolism of glycine 1-C14 by bone in vitro: effects of hormones and other Factors.
Endocrinology 70:890-901 (1962)

92 VINCENT,URIST: The appearance of osteoporosis in ambulatory institutionalised males.
Clin.Orthop.19:245 (1961)

93 VIRTAMA,P.: Determination of the mineral content of human finger bones by silver analysis in roentgenograms.
Acta anat.29:31 (1957)

94 VONWILLER,P.,LÖW,W.,SCHILLING,F.: Über die Mikrotomie des unentkalkten Knochengewebes.
Z.wiss.Mikr.47:47-57 (1930)

95 WAGNER,H.: Präsenile Osteoporose
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1965

96 WALLACH,S.,HENNEMAN,P.H.: Prolonged estrogen therapy in postmenopausal women.
J.Amer.Med.Ass. 171,13:1637 (1959)

97 WANG,C.C.,ROBBINS,L.L.: Cushings disease: its roentgenographic findings.
Radiology 67:17-25 (1956)

An dieser Stelle möchte ich dem Direktor der Marburger Medizinischen Universitätsklinik Herrn Professor Dr. med. G.-A. Martini danken, der mir die Ausführung dieser Dissertationsarbeit an seiner Klinik ermöglichte.
Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. G. Strohmeyer und Herrn Dr. H.-H. Gossmann für die freundliche Unterstützung bei der Ausarbeitung meiner Dissertation.

Lebenslauf

Am 5.IX.1941 wurde ich als zweiter Sohn des Eisenbahnobersekretärs Josef Teigeler und seiner Ehefrau Maria, geborener Wesseler in Delbrück Kreis Paderborn geboren.
Von Ostern 1948 bis zum Herbst 1950 besuchte ich die katholische Volksschule in Delbrück, anschließend die katholische Volksschule in Metelen Kreis Steinfurt bis Ostern 1952. Die Klassen Sexta bis Quarta absolvierte ich am Missionsgymnasium der Franziskaner in Bardel bei Gronau. Ostern 1955 wechselte ich die Schule und bestand am 11.II.1961 das Abitur am staatlichen Gymnasium Paulinum in Münster.
Mit dem Sommersemester 1961 begann ich das Medizinstudium an der Universität Münster und legte am 16.X.1963 dort die ärztliche Vorprüfung ab. In den zwei folgenden Semestern studierte ich an der Universität Tübingen. Nach Absolvierung der letzten vier klinischen Semester an der Universität Marburg bestand ich am 12.XII.1966 das medizinische Staatsexamen.
Am 18.XI.1966 heiratete ich die Medizinalassistentin Waltraud Kollmer.
Die Medizinalassistentenausbildung begann ich am 1.II.1967 in der Medizinischen Universitätsklinik Marburg, an der ich für sieben Monate angestellt war. Anschließend arbeitete ich für vier Monate als Medizinalpraktikant an der Orthopädischen Universitätsklinik Marburg und bin seit dem 1.II.1968 für vier Monate in der Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Gummersbach beschäftigt.

Meine vorklinischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Münster

Altevogt, Becher, Brettschneider, Caspers, Eichner, Erhardt, Fritz, Gräbener,Kappler, Klemm. Knoche, Lehnartz, Lerche, Menne, Micheel, Müller-Limroth, Pauleickhoff, Pieper, Rotschuh, Schratz, Schütz, von Verschner, Witzleb.

Meine klinischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Tübingen

Bader, Bauer, Betzler, Bock, von Brunn, Dick, Dortenmann, Eggstein, Goessner, Gohrbrandt, Groß, Jeus, Jung, Kallee, Kaufmann, Lembeck, Letterer, Lukas, Mende, Mißmahl, Probst, Rathke, Schulte, Seybold, Spechter, Wundt.

in Marburg

Beckmann, Behrend, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Buchholz, Dölle, Exner, Gedigk, Hamm, Hardewig, Heuser, Hettler, Hildebrandt, Jakob, Knauff, Kunz, Lang, Linneweh, Lübbers, Martini, Marx, du Mesnil de Rochement, Neubauer, Nocke, Oehme, Oehmig, Poetschke, Rohen, Rodeck, Salfeld, Sauer, Schermuly, Schiff, Schleyer, Schmidt, Schrappe, Schürmann, Schwaiger, Siegert, Siess, Spiegelberg, Straub, Streicher, Würterle.